UNTERSUCHUNG ZUR PATHOGENITÄT VON YERSINIA ENTEROCOLITICA CHARAKTERISIERUNG UND TRANSFER DES VWA-PLASMIDES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
BÄRBEL HAURÖDER-PHILIPPCZYK
geb. HAURÖDER
aus
NEUWIED

BONN 1986

UNTERSUCHUNG ZUR PATHOGENITÄT VON YERSINIA ENTEROCOLITICA CHARAKTERISIERUNG UND TRANSFER DES VWA-PLASMIDES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
BÄRBEL HAURÖDER-PHILIPPCZYK
geb. HAURÖDER
aus
NEUWIED

BONN 1986

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. J. Krämer

2. Referent: Prof. Dr. H.-G. Trüper

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1985

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	8
II.	MATERIAL UND METHODEN	13
1.	Herkunft der Stämme	13
2.	Vollnährmedien	14
3.	Differentialnährmedien	15
4.	Verdünnungspuffer und andere Lösungen	16
5.	Bestimmung der Lebendzellzahl	17
6.	Isolierung von Plasmid-DNA	17
6.1.	Puffer und Lösungen	17
6.2.	Isoliervorgang	18
7.	Reinigung der DNA	19
7.1.	Extraktion mit Phenol	19
7.2.	Reinigung mittels Zentrifugation durch Sephadex G 50	19
8.	Agarose-Gel-Elektrophorese	20
8.1.	Puffer	20
8.2.	Durchführung der Elektrophorese	20
9.	Verdauung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	21
9.1.	Puffer und Lösungen	21
9.2.	Restriktionsverfahren	22
10.	Konjugation auf Agarplatten	22
11.	Transformation	22
12.	Test auf temperaturabhängige Calciumbedürftigkeit	23
13.	Test auf Autoagglutination	23
14.	Test auf Serumresistenz bei 37°C	24
15.	Maus-Kolonisations-Test	24
16.	Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand	25
17.	SDS-PA-Gel-Elektrophorese	25
17.1.	Stammlösungen und Puffer	25
17.2.	Herstellung des Gels	26
17.3.	Laufbedingungen	26
18.	Sonstige Methoden	27
18.1.	Bestimmung der MHK	27
18.2.	Herstellung von Streptomycin- und Nalidixinsäure-resistenten Mutanten	27

18.3.	Isolierung von Konjuganten und Transformanten	28
19.	Herkunft der Chemikalien	29
III. VERSUCHE UND ERGEBNISSE		30
1.	Koloniedimorphismus bei Y. enterocolitica	30
2.	Plasmide in Y. enterocolitica	30
2.1.	Plasmid-Screening	30
2.2.	Größenbestimmung der Plasmide	33
2.3.	Vergleichende Charakterisierung der Yersinia-Plasmide mit Hilfe von Restritkionsenzymen	36
2.3.1.	Verdauung mit Bam HI	37
2.3.2.	Verdauung mit Eco RI	38
2.3.3.	Verdauung mit Hind III	40
3.	Eigenschaften, die in Verbindung mit den 66-69 Kb großen Plasmiden auftreten	42
3.1.	Ausbildung unterschiedlicher Kolonieformen	42
3.2.	Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika bei plasmidhaltigen und plasmidlosen Stämmen	42
3.3.	Verwertung von Kohlenhydraten bei plasmidhaltigen und plasmidfreien Stämmen	43
3.4.	Calciumbedürftigkeit bei Stämmen mit und ohne Plasmid	43
3.4.1.	Plattentest	43
3.4.2.	Wachstum unter Calciummangelbedingungen	46
3.4.2.1.	Einfluß von Spontanmutanten	48
3.5.	Fähigkeit zur Autoagglutination	49
3.6.	Empfindlichkeit gegenüber menschlichem Serum	51
3.7.	Virulenz gegenüber Mäusen	52
3.7.1.	Reaktionen auf intraperitoneale Injektion von Bakterien	52
3.7.2.	Kolonisierungstest im Maus-Diarrhöe-Modell	53
3.7.3.	Verhalten isogener Paare im Maus-Diarrhöe-Modell	56
3.8.	Sezernierung von Proteinen ins Kulturmedium	57
4.	Anreicherung von plasmidtragenden Stämmen mit Hilfe von Antibiotika	59
4.1.	Bestimmung der MHK von verschiedenen Antibiotika	59
5.	Versuche, das Vwa-Plasmid mit Hilfe verschiedener Transposons zu markieren	61
5.1.	Tn 951	61

5.2.	Tn 10 und Tn 5	62
5.3.	RPl_{ts} als Vehikel für Y. enterocolitica	63
5.4.	Transposition von Tn 7 auf RPl_{ts}	64
5.5.	Transposition von Tn 501 auf RPl_{ts}	65
5.6.	Transfer von RPl_{ts}::Tn501 auf Y. enterocolitica	67
5.7.	Transfer von RPl_{ts}::Tn7 auf Y. enterocolitica	69
6.	Transposition von Tn 1 auf das Vwa-Plasmid	72
6.1.	Vergleich der Schnittmuster von Vwa und dem Plasmid der $718V^+$-Stämme	74
7.	Eigenschaften von pMB 718	74
7.1.	Koloniedimorphismus bei 37°C	75
7.2.	Calciumbedürftigkeit bei 37°C	77
7.3.	Fähigkeit zur Autoagglutination	77
7.4.	Resistenz von $718V^+$ gegenüber Humanserum	77
7.5.	Kolonisationsverhalten von $718V^+$ und $718V^-$ im Maus-Diarrhöe-Modell	78
8.	Übertragung des Vwa-Plasmides auf E. coli HB 101	80
8.1.	Versuch der Übertragung durch Konjugation	80
8.2.	Versuch einer Mobilisierung mit Hilfe von RPl_{ts}	80
8.3.	Versuch der Übertragung durch Transformation	81
9.	Expression von pMB 718 in HB 101	83
9.1.	Ausprägung des Koloniedimorphismusses	83
9.2.	Fähigkeit zur Autoagglutination	83
9.3.	Calciumbedürftigkeit	84
9.4.	Resistenz von HB $101V^+$ gegenüber Humanserum	84
10.	Eignung von Tn 1 als Marker gegenüber Y. enterocolitica	85
11.	Entwicklung eines Transformationsverfahrens für Y. enterocolitica-Stamm B85AN	86
12.	Übertragung von pMB 718 auf den Lebensmittelstamm B85AN	88
13.	Expression des Vwa-Plasmides in Stamm $B85ANV^+$	90
13.1.	Koloniedimorphismus	90
13.2.	Calciumbedürftigkeit bei 37°C	91
13.3.	Fähigkeit zur Autoagglutination bei $B85ANV^+$	91
13.4.	Verhalten des Transformanten $B85ANV^+$ gegenüber Humanserum	92
13.5.	Verhalten des Transformanten im Tierversuch	94
IV. DISKUSSION		97

V. ZUSAMMENFASSUNG 118

VI. LITERATURVERZEICHNIS 120

Abkürzungen:

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithioerythrit
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IS-Element	Insertionselement
Kb	Kilobasen
KBE	Kolonien bildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
Y.	Yersinia

I. EINLEITUNG

Y. enterocolitica ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium. Zur Gattung Yersinia gehören außer Y. enterocolitica noch sechs weitere Species, Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, Y. intermedia, Y. frederiksenii, Y. kristensenii und Y. ruckerii (s. auch Tabelle 1). Der Gattungsname geht auf van Loghem (1944) zurück. Er schlug vor, "Pasteurella pestis" und "Pasteurella pseudotuberculosis" aus der Gattung Pasteurella herauszunehmen und in eine neue Gattung einzuordnen. Diese Gattung sollte nach dem französischen Bakteriologen A. J. E. Yersin benannt werden, der als erster 1894 den Erreger der Pest entdeckte. Numerisch-taxonomische Studien (Sneath und Cowan, 1958; Talbot und Sneath, 1960; Smith und Thal, 1965; Stevens und Mair, 1973) und DNA-Hybridisierungsexperimente (Moore und Brubaker, 1975; Brenner et al., 1976) bestätigten die Richtigkeit der Abtrennung von der Gattung Pasteurella und unterstützten die von Thal (1954) vorgeschlagene Einordnung in die Familie der Enterobacteriaceae.

Y. enterocolitica selbst wurde mit seinen Charakteristika erstmals 1939 von Schleifstein und Coleman beschrieben. Die Autoren hatten fünf Stämme, die im Zusammenhang mit Infektionen beim Menschen aufgetreten waren, untersucht und auch die Bezeichnung "Bacterium enterocoliticum" vorgeschlagen. 1949 berichteten Hässig et al. über die Isolierung eines unbekannten Bakteriums, welches große Ähnlichkeit mit "Pasteurella pseudotuberculosis" zeigte und ebenfalls für Menschen pathogen war. Weitere Isolierungen dieses zwischenzeitlich auch "Pasteurella pseudotuberculosis, Type B", "Pasteurella pseudotuberculosis X" oder "Pasteurella X" genannten Organismusses wurden vor allem in Mittel- und Nordeuropa bekannt (Bottone, 1977). Frederiksen (1964) schlug schließlich nach Untersuchungen an dem Schleifstein'schen "Bacterium enterocoliticum" und "Pasteurella X" die Zusammenfassung beider Bakteriengruppen in einer neuen Species Yersinia enterocolitica vor.

In den letzten 15 Jahren ist das Interesse an Y. enterocolitica ständig gestiegen, wie die sich häufenden Berichte von klinischen Fällen und Isolierungen aus unterschiedlichen Biotopen beweisen. Waren bis 1966 in der Literatur nur 23 Fälle von Yersiniosen bekannt geworden, so besaß das "National Yersinia Identification Center" des Instituts Pasteur 1980 bereits über 7000 Stämme, darunter auch sogenannte "atypische" bzw. "Yersinia enterocolitica-like"-Stämme. Biochemisch zeichnete sich die Species Y. enterocolitica bis vor kurzem vor allem auch durch eine gewisse Heterogenität aus. Niléhn (1969) und Wauters (1970) untersuchten eine Vielzahl von Stämmen, die als Angehörige von Y. enterocolitica isoliert worden waren, und teilten sie in 5 Biotypen ein. Die zu dieser Gruppe gehörenden

Organismen wurden fortan als "typische" Y. enterocolitica-Stämme bezeichnet. DNA-Homologiestudien bestätigten diese Zuordnung (Brenner et al., 1976 und 1980; Bercovier et al., 1980a). Weiterhin haben diese Untersuchungen gezeigt, daß sogenannte "atypische " Stämme, die zunehmend aus Tieren, Lebensmitteln, der Umwelt, aber auch vom Menschen isoliert werden konnten (Bottone et al., 1974; Alonso et al., 1975; Hanna et al., 1976; Bottone und Robin, 1977; Highsmith et al., 1977), in Übereinstimmung mit biochemischen Charakteristika in insgesamt drei weitere DNA-Homologiegruppen aufgeteilt werden können. Für diese Gruppen wurden Y. intermedia (Brenner et al., 1978), Y. frederiksenii (Ursing et al., 1980) und Y. kristensenii (Bercovier et al., 1980b) vorgeschlagen. Hinweise auf die Zugehörigkeit des fischpathogenen Bakteriums Y. ruckeri zu dem Genus Yersinia waren bereits von Ewing et al. (1978) geliefert worden.

Tab. 1: Merkmale, mit denen sich die einzelnen Species des Genus Yersinia unterscheiden lassen

Merkmale	Y. pestis	Y. pseudo-tuberculosis	Y. entero-colitica	Y. intermedia	Y. frederiksenii	Y. kristensenii	Y. ruckerii
Beweglichkeit (25°C)	-	+	+	+	+	+	v[1]
Lysindecarboxylase (Møller)	-	-	-	-	-	-	v
Ornithindecarboxylase (Møller)	-	-	+	+	+	+	+
Urease	-	+	+	+	+	+	-
ß-Xylosidase	+	+	-	-	v	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	+
Citrat (Simmons'), 25°C	-	-[2]	-	+	v	-	+
Voges-Proskauer, 25°C	-	-	+	+	+	-	v
Indolbildung	-	-	v	+	+	v	-
δ-Glutamyltransferase	-	v	+	+	+	+	+
Säurebildung aus:							
Rhamnose	-	+	-	+	+	-	-
Saccharose	-	-	+	+	+	-	-
Cellobiose	-	-	+	+	+	+	-
Melibiose	v	+	-	+	-	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	+	-	-	-
Sorbose	-	-	+	+	+	+	-
Sorbit	-	-	+	+	+	+	-
Raffinose	-	v	-	+	-	-	-

[1] variabel, [2] Stämme des Serotyps IV sind Citrat-positiv

Die Tabelle wurde entnommen aus : Krieg und Holt; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 p 503 (1984)

Y. enterocolitica ist in der Natur weit verbreitet. Die Bakterien konnten außerhalb des Menschen bei einer Vielzahl von wild lebenden Tieren und Haustieren nachgewiesen werden, ohne daß die Tiere krankhafte Symptome gezeigt hätten (Hubbert, 1972; Kapperud und Jonsson, 1976; Inhoue und Kurose, 1975; Tsubokura et al., 1973; Pedersen, 1976). Auch die Berichte, nach denen Y. enterocolitica in Wasser (Lassen, 1972; Schiemann, 1978) und Lebensmitteln (Inhoue und Kurose, 1975; Leistner et al., 1975; Wauters und Janssens, 1976; Hanna et al., 1976 ; Lee, 1977; Schiemann und Toma, 1978) vorkommt, häuften sich. Die Mehrheit dieser Organismen gehörte nicht den vornehmlich in Patienten auftretenden Bio- und Serotypen an, allerdings konnten auch die als humanpathogen geltenden Serotypen O:3 (Biotyp 4), O:8 (Biotyp 1 oder 2) und O:9 (Biotyp 2) nachgewiesen werden (Wauters, 1970; Zen-Yoji et al., 1974; Leistner et al., 1975; Toma und Deiderick, 1975; Black et al., 1978). Die Mehrzahl dieser Autoren sieht dabei das Schwein als wichtigstes Reservoir für humanpathogene Stämme an.

Die starke Beachtung, die Y. enterocolitica inzwischen findet, liegt sicher nicht zuletzt an seiner klinischen und epidemiologischen Bedeutung. Am häufigsten werden Infektionen beim Menschen von Vertretern der Serotypen O:3, O:8, O:5,27 und O:9 hervorgerufen, obwohl auch andere Serotypen aus Patienten isoliert werden konnten (Weaver und Jordan, 1973; Bottone und Robin, 1977; Kay et al., 1983). Bei der von Y. enterocolitica hervorgerufenen enteralen Yersiniose können nach Knapp (1977 und 1980) folgende Verlaufsformen beobachtet werden: Enteritis/Enterocolitis, Lymphadenitis/terminale Ileitis und Septikämie. Die Enteritis tritt hierbei am häufigsten auf (Bockemühl, 1978). In etwa 25% der Fälle kommt es zu einer terminalen Ileitis (Bockemühl, 1982). Die septische Verlaufsform tritt recht selten auf, in erster Linie dann, wenn schon eine allgemeine Immunschwäche vorliegt (Knapp, 1977; Bockemühl, 1982). Als Folgeerkrankungen sind die Infektarthritis und das Erythema nodosum beschrieben worden. Diese Krankheiten können sich ein bis zwei Wochen nach Ablauf einer enteralen Yersiniose manifestieren.

Vom epidemiologischen Standpunkt ist die geographische Verteilung der an Infektionen beteiligten Serotypen interessant. So ist der Serotyp O:8 bisher ausschließlich in den Vereinigten Staaten isoliert worden. Die Serotypen O:3 und O:9 spielen in Europa die Hauptrolle, und in Kanada und Japan wurde neben dem Serotyp O:3 vielfach auch der Serotyp O:5,27 nachgewiesen.

Infektionen durch Y.enterocolitica sind pathologisch-anatomisch durch invasive Prozesse gekennzeichnet. Une (1977) wies durch Untersuchungen an experimentell infizierten Kaninchen nach, daß virulente Zellen in der Lage sind, durch das

Darmepithel hindurch in die Lamina propria und in Lymphfollikel vorzudringen und sich in Makrophagen zu vermehren. Die resultierende Enterocolitis war gekennzeichnet durch lokale Entzündungen mit Ausbreitung in das Lymphsystem und Läsionen. Nach einem septischen Verlauf der Erkrankung konnten die Organismen aus Leber, Milz und Lunge der Versuchstiere isoliert werden (Pearson et al., 1979; Carter et al., 1979).

Der Übertragungsmodus für Y. enterocolitica ist noch weitgehend ungeklärt. Obwohl die Mehrzahl der aus Lebensmitteln und Wasser isolierten Stämme zu den als apathogen geltenden Yersinien gehört, läßt die vorherrschende Lokalisierung der Erkrankung im enteralen Bereich eine auf oralem Weg erworbene, alimentäre Infektion vermuten. Tatsächlich konnte der Ausbruch enteraler Yersiniosen in einigen Fällen auf infizierte Lebensmittel zurückgeführt werden (Black et al., 1978; Shayegani et al., 1983; Tacket et al., 1985). Der Nachweis von Infektketten wird teilweise durch immer noch bestehende diagnostische Probleme, teilweise durch die 7-10tägige Inkubationszeit für Y. enterocolitica erschwert.

Neben der Lebensmittelinfektion scheint auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch und vom Tier zum Menschen möglich zu sein (Gutman et al., 1973; Wilson et al., 1976; Kist et al., 1980).

Auf der Suche nach Virulenzfaktoren in Y. enterocolitica stellten Pai und Mors (1978) die Fähigkeit zur Produktion eines hitzestabilen Enterotoxins bei den von ihnen untersuchten Stämmen fest. Dieses Enterotoxin führte ähnlich dem aus enteropathogenen E. coli-Stämmen isolierten Enterotoxin über eine Aktivierung der Guanylatcyclase zur Sekretion von Wasser und Elektrolyten (Pai und Mors, 1978). Nachdem es sich gezeigt hatte, daß die Enterotoxinbildung aber nur unterhalb einer Temperatur von 30°C erfolgte und auch in einer Reihe von nicht pathogenen Umweltstämmen nachgewiesen werden konnte, wurde ihre Bedeutung für die Pathogenese wieder fraglich (Pai et al., 1978).

In erster Linie dürfte die Virulenz von Y. enterocolitica nach dem heutigen Kenntnisstand durch ein Plasmid in der Größe von 63-69 Kb bestimmt werden. Zink et al. (1980) und wenig später auch Gemski et al. (1980) haben als erste einen Zusammenhang zwischen der Invasivität bzw. der Virulenz und der Anwesenheit eines 60-70 Kb großen Plasmides bei Vertretern des Serotyps O:8 beobachtet. Extrachromosomale DNA war auch in Patientenstämmen des Serotyps O:3 und in Stämmen, die aus Faeces und Fleisch von gesunden Schlachtschweinen isoliert worden waren und apathogenen Sero- und Biotypen angehörten, nachgewiesen worden (Haurö-der, 1980).

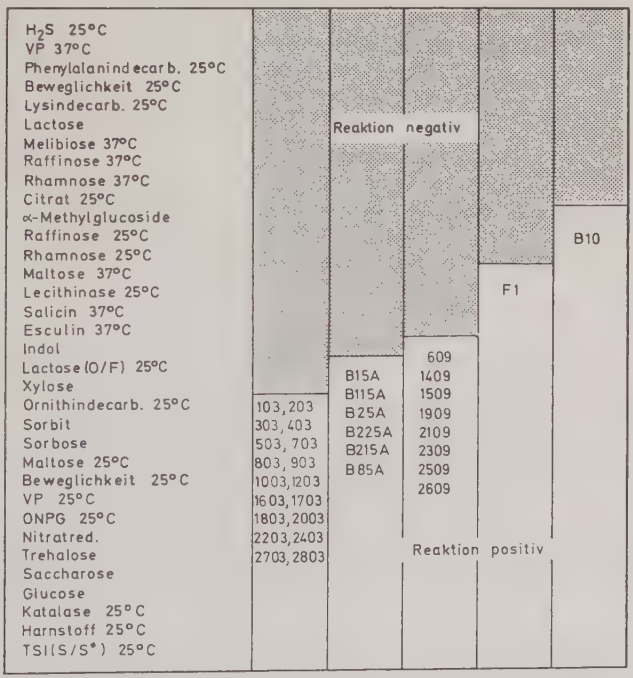
Vor diesem Hintergrund tauchte die Frage auf, ob bei den "europäischen" Serotypen O:3 und O:9 ähnliche Plasmide an der Ausprägung der Virulenz beteiligt sind,

und welche Eigenschaften diese Plasmide den Stämmen vermitteln. Weiterhin bestand Unsicherheit hinsichtlich der seuchenhygienischen Bedeutung von Y. enterocolitica, besonders bei den oft aus Lebensmitteln und Wasser isolierten Stämmen, die nicht den Serotypen O:3 und O:9 angehörten. Teilweise wurde die Forderung nach der Einführung der Meldepflicht für diese Bakterien laut (Primavesi, 1980). Wichtig erschien es in diesem Zusammenhang, die Transfereigenschaften des für die Virulenz verantwortlich gemachten Plasmides zu untersuchen. Handelt es sich beispielsweise um ein konjugatives Plasmid, welches frei innerhalb der Species ausgetauscht und auch exprimiert werden kann, so müßten prinzipiell alle Vertreter dieser Species als potentiell pathogen angesehen werden.
In der vorliegenden Arbeit sollten die in Bonn isolierten Stämme auf die Anwesenheit von Virulenzplasmiden hin untersucht werden. Diese Plasmide sollten einer vergleichenden Charakterisierung mit anderen Virulenzplasmiden von Y. enterocolitica unterzogen werden und auf die Expression von Virulenzeigenschaften und brauchbaren Selektionsmarkern hin untersucht werden. Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob das Virulenzplasmid auch auf nicht pathogene Stämme innerhalb der Species übertragen werden konnte, ob das Plasmid möglicherweise konjugativ war, und ob und in welchem Umfang die Plasmid-determinierten Eigenschaften in einem anderen Stamm ausgeprägt würden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Herkunft der Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden humanpathogene Stämme von Y. enterocolitica der Serotypen O:3 und O:9 sowie apathogene Stämme des Serotyps 5A untersucht. Die humanpathogenen Stämme wurden aus menschlichem Untersuchungsmaterial isoliert und gehören zur Stammsammlung der Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittelmikrobiologie der Universität Bonn. Die apathogenen Stämme des Serotyps 5A sowie unbekannter Serotypen wurden aus Fleisch und Faeces gesunder Schlachtschweine isoliert (Hauröder, 1980). Alle Stämme wurden biochemisch charakterisiert. Abb. 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten biochemischen Merkmale dieser Stämme.



*=Säurebildung
Falls keine Temperatur vermerkt ist, wurden die Tests bei 25°C und 37°C durchgeführt.

Abb. 1: Biochemische Merkmale der verwendeten Y. enterocolitica-Stämme

Die Y. enterocolitica-Stämme WA 314, Serotyp O:8 und MCH 628, Serotyp O:3 wurden freundlicherweise von Herrn Dr. P. Gemski vom Walter Reed Army Institute of Research , Washington D.C., zur Verfügung gestellt, ebenso F'lac$_{ts}$::Tn10/Tn5. Für genetische Experimente wurden außerdem folgende Stämme verwendet: Die E. coli K12-Stämme UB 5203, UB 5236 und UB 281 wurden von Herrn Dr. Kopecko vom Walter Reed Army Institute of Research, Washington D.C., bereitgestellt. Die E. coli K12-Stämme SK 1592, C_{600} und HB 101 stammten aus der Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn von Herrn Prof. Dr. Wiedemann. Die Charakteristika dieser Stämme werden bei der Beschreibung der entsprechenden Versuche vorgestellt.

2. Vollnährmedien

2.1. Stammkulturagar

Zur Haltung der Stammkulturen wurde ein Medium mit:

Pepton aus Fleisch	25,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	1,3 g
H_2O	1000,0 ml hergestellt. Der

pH-Wert wurde auf 7,4± eingestellt.Die Stämme wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2. Luria-Broth (LB)

Zur Anzucht der Stämme wurde Luria-Broth verwendet. Das Medium setzte sich zusammen aus:

Trypton	10,0 g
NaCl	0,5 g
Hefeextrakt	5,0 g
H_2O	1000,0 ml; pH 7,0± 0,2.

Das Wachstum in diesem Medium konnte durch Zusatz von Glucose (1% Endkonzentration) verbessert werden.

2.3. Brain-Heart-Infusion (BHI)

BHI (Fa.Difco) wurde eingesetzt, wenn eine besonders hohe Zellzahl gewünscht wurde oder die Bakterien von einer Stammkultur überimpft wurden.

2.4. Trypton-Soja-Agar (TSA)

Dieses Fertigmedium der Fa. Oxoid diente als Standardmedium zur Herstellung von Nähragarplatten.

3. Differentialnährmedien

3.1. Mac Conkey-Agar Nr.3 (MC)

Das für gramnegative Bakterien selektive Nährmedium (Fa. Oxoid) wurde zur Rückisolierung von Y. enterocolitica aus Mäusekot oder zur Überprüfung der Reinheit der Stämme eingesetzt.

3.2. Dreizucker-Eisen-Agar (TSI)

Der von der Fa. Oxoid bezogene TSI eignet sich zur Schnelldifferenzierung von Y. enterocolitica aus Mischkulturen. Die Anwendung erfolgte in 3ml Schrägagarröhrchen. Charakteristisch für Y. enterocolitica ist dabei eine Gelbfärbung der Schrägfläche infolge der Säureproduktion sowie das Fehlen einer Gasbildung.

3.3. Iso-Sensitest-Agar (Iso)

Das zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen entwickelte Testmedium (Fa. Oxoid) wurde zur Herstellung von Antibiotika-Selektivplatten sowie zur Überprüfung von Antibiotikaresistenzen verwendet.

3.4. Minimalsalz-Medium

Zur Herstellung dieses Mediums wurden 15 g gereinigter Agar (Fa. Oxoid) mit 900 ml $H_2O_{dest.}$ vermischt und autoklaviert (15 min, 121°C). Anschließend wurden 100 ml einer 10fach konzentrierten Salzlösung zugefügt. Für die Salzlösung wurden:

NaCl	0,5 g
K_2HPO_4	10,5 g
KH_2PO_4	4,5 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4$	0,05 g

unter Erhitzen gelöst und mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt. Zusätzlich wurden Kohlenhydrate in einer Konzentration von 1% (Endkonzentration) sowie bei Bedarf Aminosäuren und Vitamine zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,2± eingestellt. Aminosäuren und Vitamine wurden als 1%ige Stammlösungen zubereitet und sterilfiltriert. Die Stammlösungen für Kohlenhydrate waren 20%ig und wurden ebenfalls

sterilfiltriert.

3.5. Magnesium-Oxalat-Agar (MGOX)

Die Grundlage für dieses Medium bildete Blutagar-Grundsubstrat (BAB) der Fa. Oxoid. Nach dem Autoklavieren (15 min, 121°C) wurden diesem Grundmedium Natriumoxalat und $MgCl_2$ jeweils in einer Endkonzentration von 20 mM steril zugefügt. MGOX wurde zum Nachweis der Calciumabhängigkeit verwendet. Aufgrund des Oxalatgehaltes liegt die Calciumionenkonzentration in diesem Medium unter 20 mM.

3.6. Testmedium für die Verwertung von Kohlenhydraten

Das Grundmedium setzte sich zusammen aus:

Pepton	10,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
NaCl	5,0 g
Andrade-Indikator	10,0 ml
H_2O	1000,0 ml; pH 7,2±0,2.

Zur Herstellung des Andrade-Indikators wurden 0,5 g Säurefuchsin in 16 ml 1,0 N NaOH und 100 ml H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 2,0 N NaOH auf 7,4 eingestellt. Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurden Kohlenhydrate in einer Endkonzentration von 0,5 bis 1,0 % zugegeben.

3.7. RPMI-Medium

Dieses für die Anzucht von Zellkulturen entwickelte Minimalmedium (Fa. Flow) wurde zur Überprüfung der Autoagglutinationsfähigkeit der Bakterien verwendet.

4. Verdünnungspuffer und andere Lösungen

4.1. Natriumphosphat-Puffer (1/15 M, nach Sørensen)

Stammlösung A bestand aus:	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	9,2 g
	H_2O	1000,0 ml
Stammlösung B enthielt:	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	11,88 g
	H_2O	1000,0 ml

Zur Herstellung von 1000 ml Puffer mit einem pH-Wert von 7,6 wurden 883,4 ml der Lösung A mit 116,6 ml der Lösung B vermischt.

4.2. Antibiotikalösungen

Von den benötigten Antibiotika wurden 1000fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt. Nalidixinsäure wurde dabei in wenig 1 N NaOH gelöst, Trimethoprim löste sich in DMSO. Sämtliche Lösungen wurden sterilfiltriert und in Aliquoten bei -20°C eingefroren.

5. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl bzw. der Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) erfolgte im Oberflächenverfahren. Dazu wurden die Zellsuspensionen in logarithmischer Reihe verdünnt und je 0,1 ml der geeigneten Verdünnungsstufen auf einem Vollmedium (TSA) ausplattiert. Nach 24stündiger Bebrütung bei der vom Versuch abhängigen Temperatur (25°C oder 37°C) wurden die Platten ausgewertet und die Anzahl der KBE ermittelt.

6. Isolierung von Plasmid-DNA (nach Birnboim und Doly, 1979)

6.1. Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA benötigt:

6.1.1. Tris-EDTA-Puffer (TE); pH 8,0

enthielt:	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	Na_2EDTA (pH 8,0)	1 mM

6.1.2. Tris-EDTA-NaCl-Puffer (TES); pH 8,0

enthielt:	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	Na_2EDTA (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	50 mM

Beide Lösungen wurden aus sterilen Stammlösungen hergestellt und bei 4°C gelagert.

6.1.3. Lysis-Puffer

Lösung I bestand aus:	Glucose	50 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	Na_2EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Lysozym	2 mg/ml

Die Lösung wurde aus 10fach konzentrierten, sterilen Stammlösungen zusammenpipettiert. Lysozym wurde kurz vor Gebrauch als Pulver zugefügt.

Lösung II enthielt:	NaOH	0,2 N
	SDS	1,0 %

Diese Lösung war bei Raumtemperatur etwa 8 Tage haltbar.

6.1.4. Tris-Acetat-Lösung

Die Lösung setzte sich zusammen aus:

Natriumacetat	100 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM

Die Lösung wurde ebenfalls aus sterilen Stammlösungen bereitet und bei 4°C gelagert.

6.1.5. Natriumacetat-Lösung (3M, pH 4,8)

beinhaltete:	Natriumacetat	246,09 g
	H_2O	1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 4,8 eingestellt.

6.2. Isoliervorgang

5 ml einer in LB oder BHI angezogenen Übernachtkultur (OD_{550}= 0,8) wurden 15 min lang bei 6000-7000 Upm (Beckman, JA20) und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml frischem Vollmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in 0,1 ml Lösung I aufgenommen und 30-60 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Lösung II zugesetzt und vorsichtig untergemischt. Nach 5minütiger Inkubation bei 0°C wurden 0,15 ml Natriumacetat-Lösung (3 M) zugefügt und durch behutsames Schütteln des Reaktionsgefäßes verteilt. Das Gemisch wurde dann mindestens 60 min lang bei 0°C gehalten. Bei diesem Schritt wurden Proteine, Membranbruchstücke und chromosomale DNA ausgefällt. Eine längere Inkubation resultierte in besseren Präparationen, die weniger kontaminierende Proteine oder chromosomale Bruchstükke enthielten. Anschließend erfolgte eine 60minütige, hochtourige Zentrifugation bei 15000-20000 Upm (Beckman, JA20) und 4°C. 0,4 ml des Überstandes wurden in ein sauberes Zentrifugenröhrchen übertragen und mit 0,8 ml eiskaltem Ethanol (98%ig) vermischt. Die DNA wurde dann 2 h lang oder länger bei -20°C gefällt. Bei geringeren DNA-Konzentrationen konnten höhere Ausbeuten erzielt werden, wenn die Fällung über Nacht erfolgte. Die präzipitierte DNA wurde bei 5000-6000 Upm (Beckman, JA20) und 10°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1 ml Tris-Acetat-Lösung resuspendiert und erneut mit dem 2fachen Volumen Ethanol 30-60 min lang bei -20°C gefällt. Dieser Fällungsschritt wurde noch einmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment in 0,1 ml TE- oder TES-Puffer aufgenommen. Wenn die DNA sich vollständig gelöst hatte, wurde etwa 1 h lang hochtourig bei 15000-20000 Upm (Beckman, JA20) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß übertragen. Die DNA-Präparation wur-

de gelelektrophoretisch untersucht oder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Methode läßt sich auch auf größere Volumina umrechnen.

7. Reinigung der DNA

7.1. Extraktion mit Phenol

War eine zusätzliche Reinigung der Plasmid-DNA nötig, so wurde diese im Anschluß an die erste Ethanolpräzipitation durchgeführt. Das Sediment wurde dazu in 0,4 ml TES-Puffer aufgenommen und mit 0,4 ml verflüssigtem Phenol, gesättigt mit TE-Puffer, vermischt. Durch eine Zentrifugation bei 4000-5000 Upm (Beckman, JA20) und 25°C erhielt man eine Trennung in 2 Phasen. Zwischen beiden Phasen bildete sich in der Regel ein weißes Präzipitat aus denaturierten Proteinen. Die obere wässrige Phase wurde in ein sauberes Zentrifugenröhrchen übertragen. Aus dieser Lösung wurde die DNA dann erneut mit dem 2fachen Volumen eiskalten Ethanols, wie oben beschrieben, gefällt. Die Fällung wurde noch zweimal wiederholt, bevor die Plasmid-DNA in 0,1 ml TE-Puffer aufgenommen wurde.

7.2. Reinigung mittels Zentrifugation durch Sephadex G 50 (nach Maniatis et al., 1982)

7.2.1. Vorbereitung von Sephadex G 50 (medium)

30 g Sephadex G 50 (medium) wurden mit 250 ml TE-Puffer vermischt, bis das Gelpulver sich gut verteilt hatte. Diese Mischung wurde 15 min lang bei 121°C autoklaviert und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und durch das gleiche Volumen frischen TES-Puffers ersetzt. Gut verschlossen konnte das so vorbereitete Gel bei 4°C aufbewahrt werden.

7.2.2. Zentrifugation durch Sephadex G 50

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde mit einer möglichst kleinen Kanüle (24 G) eine kleine schräge Öffnung gestochen, so daß die Spitze der Kanüle eben hervortrat. Das Eppendorfgefäß wurde nun mit 0,9 ml vorbereitetem Sephadex G 50-Gel gefüllt und in ein zweites Reaktionsgefäß gesetzt, bei dem die Kappe entfernt worden war. Beide Eppendorfgefäße wurden in ein passendes Zentrifugenröhrchen gestellt. Die Zentrifugation erfolgte 4 min lang bei 1600 g in einem Ausschwingrotor. Da das Gelmaterial während der Zentrifugation zusammensackte, wurde solange Sephadex G 50-Gel zugefügt, bis die gepackte Säule ein Volumen von 0,9 ml hatte. Anschließend mußte die Säule zweimal mit je 0,1 ml TE-Puffer equilibriert werden. Die Zentrifugation erfolgte jedesmal 4 min lang bei 1600 g. Danach wurde die zu reinigende DNA in 0,1 ml TE-Puffer auf die Säule gegeben und

bei genau der gleichen Zeit und Geschwindigkeit wie zuvor zentrifugiert. Die DNA-Probe wurde in einem frischen Eppendorfgefäß aufgefangen.
Das System wurde mit Dextranblau (anstelle von DNA) und Bromphenolblau (anstelle von niedermolekularen Substanzen) getestet.

8. Agarose-Gel-Elektrophorese

8.1. Puffer

8.1.1. Tris-Borat-Puffer (TBE)

TBE-Puffer wurde als Laufpuffer verwendet und hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-Base	89,0 mM
Borsäure	89,0 mM
Na_2EDTA	2,5 mM

Der Puffer wurde als 10fach konzentrierte Lösung angesetzt und vor Gebrauch entsprechend verdünnt.

8.1.2. Probenpuffer (6fach)

Der DNA-Probenpuffer wurde 6fach konzentriert angesetzt und verwendet. Die Herstellung erfolgte mit:

Bromphenolblau	0,25 %	
Saccharose (w/v)	40,0 %	in H_2O.

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

8.2. Durchführung der Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen (11,9 x 19 cm oder 23,0 x 19 cm). Die Agarosekonzentration betrug 0,7 %. Dazu wurde die jeweils benötigte Menge Agarose (Marine Colloids) mit 100 ml oder 150 ml TBE-Puffer vermischt und erhitzt, bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C (im Wasserbad) konnte das Gel gegossen werden. Die Probenlöcher wurden mit Hilfe eines Plastikkammes geformt. Die Polimerisation des Gels dauerte bei Raumtemperatur 30-60 min. Danach wurde der Kamm entfernt und das Gel mit den Proben beschickt. In der Regel wurden jeweils 20 µl DNA-Probe mit 5 µl Probenpuffer vermischt. Die Auftrennung konnte erheblich verbessert werden, wenn vor dem Auftragen des Probenmaterials die Geltaschen sowie die gesamte Geloberfläche mit Laufpuffer bedeckt wurden. Dies verhinderte eine partielle Überhitzung des Gels, wie sie beim Austrocknen des Gels während des Laufes auftreten kann.
Die Läufe wurden über 4-6 Stunden bei 50 mM und 150 Volt unter Wasserkühlung

durchgeführt.

DNA-Fragmente, wie sie nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen entstanden, wurden in 23,0 x 19,0 cm großen 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Einwanderung der DNA-Fragmente ins Gel erfolgte bei 50 mA und 150 Volt. Nach 15-30 min wurde die Leistung auf 15 mA und 150 Volt reduziert. Die Laufzeit betrug dann 18-24 Stunden.

Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele 30-60 min in H_2O mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Auswertung erfolgte auf einem Transluminator mit UV-Licht der Wellenlänge 305 nm.

Fotographische Aufnahmen wurden mit einer Sofortbildkamera unter UV-Beleuchtung und Verwendung eines Gelbfilters (entsprechend Kodak Wratten Nr. 9) auf Polaroid Type 665, Positiv/Negativ-Film, gemacht. Die Filmempfindlichkeit betrug 21 DIN.

9. Verdauung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

9.1. Puffer und Lösungen

Die Reaktionspuffer für die Restriktionsenzyme wurden 10fach konzentriert hergestellt und verwendet. Sämtliche Puffer wurden sterilfiltriert und in kleinen Mengen bei -20°C gelagert.

9.1.1. Reaktionspuffer für Eco RI (10fach); pH 7,5

Tris-HCl (pH 7,5)	100,0 mM
$MgCl_2$	10,0 mM
NaCl	50,0 mM
2-Mercaptoethanol	1,0 mM

9.1.2. Reaktionspuffer für Bam HI (10fach); pH 8,0

Tris-HCl (pH 8,0)	10,0 mM
$MgCl_2$	5,0 mM
NaCl	100,0 mM
2-Mercaptoethanol	1,0 mM

9.1.3. Reaktionspuffer für Hind III (10fach); pH 7,6

Tris-HCl (pH 7,6)	10,0 mM
$MgCl_2$	10,0 mM
NaCl	50,0 mM
2-Mercaptoethanol	1,0 mM

9.1.4. RNase-Lösung

RNase aus Pankreas	2,0 mg/ml
Tris-HCl (pH 7,5)	10,0 mM
NaCl	15,0 mM

Die Lösung wurde 15 min lang auf 100°C erhitzt und dann langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. So bereitete RNase-Lösung wurde in kleinen Mengen bei -20°C eingeforen.

9.2. Restriktionsverfahren

Die Verdauungen wurden abhängig von der Konzentration der DNA mit unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Die am häufigsten verwendeten Mengen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 2: Reaktionsgemische für Restriktionsverfahren

DNA	RNase	Enzym (verdünnt)	Reaktions-puffer (10x)	Gesamt-volumen
45 µl	5 µl	4 µl (3U)	6 µl	60 µl
35 µl	5 µl	5 µl (3U)	5 µl	50 µl
20 µl	5 µl	4 µl (1U)	3 µl	30 µl

Die DNA wurde 30 min lang bei 37°C mit RNase inkubiert. Anschließend wurden der entsprechende Reaktionspuffer (10fach) und das Enzym zugefügt und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Nach raschem Abkühlen in Eis wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und wie oben beschrieben in Agarose-Gelen analysiert.

10. Konjugation auf Agarplatten

Je 10 ml BHI in einem Erlenmeyerkolben wurden 2%ig mit einer Übernachtkultur von Donor- und Rezipientenstamm angeimpft und bei 25° bzw. 37°C bis zu einer OD_{550}= 0,5 inkubiert. Die Rezipientenkultur wurde dann 3 min lang bei 54°C gehalten. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Donorkultur zu 100 µl der Rezipientenkultur auf eine TSA-Platte gegeben und mit einem Glasspatel vermischt. In gleicher Weise wurden von Donor- und Rezipientenkultur Kontrollplatten angelegt. Die Platten wurden über Nacht inkubiert (25°C). Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Zellen mit 0,5 ml Verdünnungspuffer von den Agarplatten abgeschwemmt und in geeigneten Verdünnungsstufen auf die entsprechenden Selektivmedien ausplattiert. Die Kontrollen wurden in gleicher Weise behandelt und dienten dem Ausschluß von Spontanmutanten.

11. Transformation (modifiziert nach Lederberg und Cohen, 1974)

30 ml Vollmedium (LB oder BHI) wurden mit einer frischen Übernachtkultur des

als Rezipienten vorgesehenen Stammes 1%ig angeimpft. Bei 37°C wurden die Zellen bis zu einer OD_{550}= 0,6 inkubiert. Dann wurden die Organismen rasch in einer Kältemischung (Eis/NaCl) abgekühlt und bei 5000 Upm (Beckman, JA20) und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 30 ml kalter NaCl-Lösung (0,1 M) gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das Sediment wurde danach in 15 ml kalter $CaCl_2$-Lösung (0,1 M) resuspendiert und 12-24 Stunden im Eisbad gehalten. Anschließend wurden die Zellen nach einer neuerlichen Zentrifugation in 1,5 ml kalter $CaCl_2$-Lösung (0,1 M) aufgenommen. Diese Vorbehandlung der Zellen war nötig, um die Zellwände durchlässiger für DNA-Moleküle zu machen. Es wurde eine künstliche Kompetenz erzielt.
Zu je 0,2 ml der auf diese Weise "kompetent" gewordenen Rezipientenzellen wurden 0,1 ml gereinigte (s.7.2.2.), gekühlte DNA in TE-Puffer zugegeben und 2 h im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde die Mischung einem Hitzeschock ausgesetzt (3 min bei 42°C) und sofort wieder abgekühlt. Je 0,1 ml des Transformationsgemisches wurden nun in 2 ml vorgewärmtes Vollmedium (LB) gegeben. Die Aussaat geeigneter Verdünnungs- oder Konzentrationsstufen auf Selektivmedien erfolgte nach 18-24stündiger Inkubation bei 25°C.

12. Test auf temperaturabhängige Calciumbedürftigkeit

Eine in Vollmedium angezogene Übernachtkultur (18 h, 25°C) wurde 10^{-5} in Phosphatpuffer verdünnt. Aus der Verdünnungsstufe 10^{-5} wurden je 10 µl auf MGOX-Agar und auf BAB-Medium ausplattiert. Die Platten wurden zunächst 18 h lang bei 37°C inkubiert. Die auf MGOX-Agar gewachsenen Kolonien wurden gezählt und markiert und mit der Anzahl der auf BAB-Agar gebildeten Kolonien verglichen. Beide Platten wurden dann 18 h lang bei 25°C weiterebrütet und erneut ausgewertet. Die Differenz aus der bei 37°C und 25°C erhaltenen Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten auf MGOX-Agar verglichen mit dem bei BAB-Medium auftretenden Unterschied ergab die Anzahl der bei 37°C calciumabhängigen Zellen.

13. Test auf Autoagglutination (nach Laird und Cavanaugh, 1980)

Als Testmedium wurde LB ohne Zusatz von Glucose verwendet. 3 ml Testmedium wurden 1%ig aus einer frischen Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C bebrütet. Nach 12-18 h konnte der Test ausgewertet werden.
Als positive Reaktion wurde ein flockiger Niederschlag am Boden des Röhrchens gewertet. Besonders gut wurde die Flockenbildung beim vorsichtigen Aufschütteln des Röhrchens beobachtet. Hatte sich ein punktförmiges Sediment gebildet, oder war die Lösung homogen getrübt, so galt die Reaktion als negativ.

14. Test auf Serumresistenz bei 37°C (nach Pai und deStephano, 1982)

Die Stämme wurden über Nacht (18 h) und bei 25°C in 10 ml BHI angezogen. 5 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (10 min, 7000 Upm) und in 5 ml frischer BHI-Lösung, versetzt mit 20 mM $MgCl_2$ und 20 mM Natriumoxalat, resuspendiert. Nach einer 3stündigen Bebrütung bei 37°C wurden die Zellen erneut sedimentiert (10 min, 7000 Upm) und in Phosphatpuffer aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min bei 37°C gehalten, bevor Humanserum in einer Konzentration von 10 % (Endkonzentration) zugefügt wurde. Nach 0, 30, 60 und 120 min wurden Proben entnommen und die Anzahl der KBE bestimmt.
Das verwendete Humanserum stammte aus Routineuntersuchungen von Patienten. Das stets gut gekühlte Serum wurde sofort nach Erhalt sterilfiltriert und in Portionen á 1,2 ml bei -20°C eingefroren.
Mehrfach aufgetautes Serum konnte für den Test nicht mehr verwendet werden.

15. Maus-Kolonisations-Test (nach Laird und Cavanaugh, 1980)

Vor Versuchsbeginn wurden die Bakterienstämme auf die Anwesenheit des Plasmides hin überprüft. Die für den Versuch ausgewählten Stämme wurden mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers dicht auf eine TSA-Platte ausgeimpft und über Nacht bei 25°C bebrütet. Am folgenden Tag wurde der Bakterienrasen mit 2 ml sterilem Phosphatpuffer abgeschwemmt. Die Suspension wurde mit sterilem Leitungswasser auf 50 ml aufgefüllt. Dieses Wasser diente zur Infektion der Tiere.
Pro Bakterienstamm wurden 3 weiße Mäuse aus Inzucht (BLAB/cHan oder Walter Reed ICR) in einem Alter von 2-3 Wochen verwendet. Die Tiere wurden zu dritt in Käfige gesetzt und einen Tag lang ohne Wasser und Futter gehalten. Am nächsten Tag erhielten die Mäuse Futter und das mit Bakterien beimpfte Wasser. Teilweise eingesetzte Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge steriles Wasser.
Alle zwei Tage wurden von sämtlichen Tieren individuelle Faecesproben gesammelt und auf die Anwesenheit der gefütterten Stämme hin untersucht. Dazu wurde Faecesmaterial auf Mac Conkey-Agar ausgestrichen. Von verdächtigen Kolonien wurden Subkulturen angelegt. Auf TSI-Agar wurden diese Kulturen auf das für Y. enterocolitica charakteristische Verhalten hin überprüft. Außerdem wurde bei den aus den Tieren reisolierten Stämmem die Anwesenheit des Plasmides untersucht.
Die Tiere durften von dem infizierten Wasser trinken, bis sie keinen Durst mehr hatten. Nach 6 Tagen wurde das Wasser gegen frisches, steriles Leitungswasser ersetzt.
Die Käfige wurden alle 6 Tage gereinigt.

16. Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand (nach Heesemann et al., 1984)

Eine frische Übernachtkultur, angezogen in BHI (25°C), wurde im Verhältnis 1:30 mit 300 ml frischer BHI-Nährlösung verdünnt und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (7000 Upm, 4°C) und in 300 ml frischer BHI-Bouillon, der je 20 mM $MgCl_2$ und Natriumoxalat zugegeben worden waren, resuspendiert. Die Bebrütung wurde 3 h lang bei 37°C fortgesetzt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellüberstände abgehoben und sterilfiltriert. Den Überständen wurde langsam und unter ständigem Rühren im Eis festes, fein gemahlenes Ammoniumsulfat zugefügt, bis eine Endkonzentration von 3 M erreicht war. Die Fällung wurde über Nacht bei 4°C fortgeführt. Anschließend wurden die Präzipitate bei 6000 Upm und 4°C (Beckman, JA14) sedimentiert und in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (6000 Upm, 4°C, Beckman, JA20) und das Sediment in 1,5 ml Probenpuffer (s. 17.1.5.) aufgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

17. SDS-PAG-Elektrophorese (nach Laemmli, 1970)

17.1. Stammlösungen und Puffer

17.1.1. Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung:

Acrylamid	30,0 g
Bisacrylamid	0,8 g
$H_2O_{dest.}$	100,0 ml

Die Lösung wurde filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit beträgt etwa 4 Wochen.

17.1.2. Sammelgelpuffer; pH 6,8

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,4 %

17.1.3. Trenngelpuffer; pH 8,8

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 %

17.1.4. Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (Per)

Ammoniumperoxodisulfat	10 %

Diese Lösung wurde stets frisch angesetzt.

17.1.5. Probenpuffer; pH 8,0

Tris-HCl (pH 8,0)	10,0	mM
Na_2EDTA (pH 8,0)	1,0	mM
Glycerin	10,0	%
SDS	1,0	%
DTT	5,0	%
Bromphenolblau	0,001	%

17.2. Herstellung des Gels

Die Elektrophorese wurde in vertikalen Plattengelen durchgeführt. In die fertig zusammengesetzte Apparatur wurden zunächst 50 ml Trenngel eingefüllt. Das Trenngel war 12%ig und enthielt:

Bis/Acrylamid-Stammlsg.	18,0 ml
TEMED	50,0 µl
Trenngelpuffer	12,5 ml
$H_2O_{dest.}$	19,0 ml

Die Gel-Lösung wurde entgast und unmittelbar vor dem Einfüllen in die Gelapparatur mit 0,4 ml Per (10%ig) vermischt. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Apparatur mit 20 ml Sammelgel aufgefüllt. Dazu wurden zusammenpipettiert:

Bis/Acrylamid-Stammlsg.	2,6 ml
TEMED	20,0 µl
Sammelgelpuffer	5,0 ml
$H_2O_{dest.}$	12,0 ml

Diese Lösung wurde ebenfalls entgast und vor dem Einfüllen mit 0,2 ml Per versetzt.
Nachdem das Gel vollständig auspolimerisiert war (über Nacht bei Raumtemperatur), konnte der Probenkamm vorsichtig entfernt werden.

17.3. Laufbedingungen

Als Laufpuffer diente Tris-Glycin-Puffer mit folgender Zusammensetzung:

Tris-Base		6,0 g
Glycin		28,8 g
SDS		1,0 g
H_2O	ad	1000,0 ml

Das Gel wurde 30 min lang bei 60 Volt vorlaufengelassen. Die Proben wurden vor

dem Auftragen 3-5 min lang gekocht und wieder abgekühlt. Pro Lauf wurden, abhängig von der Proteinkonzentration, 30-100 µl Probenmaterial verwendet. Der Lauf wurde bei 50 Volt durchgeführt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Nach dem Eindringen der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Während des gesamten Laufes wurde das Gel auf ca. 4°C gekühlt. War der Lauf beendet (nach etwa 7 h), wurde das Gel aus der Apparatur genommen und eine Stunde lang in der folgenden Lösung fixiert:

Trichloressigsäure	57,0 g
Sulfosalicylsäure	17,0 g
Methanol	150,0 ml
H_2O	350,0 ml

Daran schloß sich eine 2stündige Färbung in der nachstehenden Lösung an:

Coomassi Blue R-250	1,0 g
Methanol	182,0 ml
Eisessig	37,0 ml
H_2O	182,0 ml

Entfärbt wurde über Nacht in Entfärbelösung aus:

Ethanol	600,0 ml
Eisessig	200,0 ml
H_2O	1200,0 ml

18. Sonstige Methoden

18.1. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bestimmung der MHK wurde in Iso-Sensitest-Broth (Fa. Oxoid) durchgeführt. Von den zu testenden Antibiotika wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) in je 3 ml Testmedium angelegt. Eine frische, in BHI angezogene Übernachtkultur (OD_{550}=0,9) wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt. Mit je 50 µl dieser Suspension wurden die antibiotikahaltigen Nährlösungen sowie eine hemmstoffreie Kontrolle angeimpft. Die Kulturen wurden bei 25°C bebrütet. Der Test wurde abgelesen, wenn sich im Kontrollröhrchen ein sichtbares Wachstum zeigte (OD_{550}= 0,6-0,7). Als MHK wurde die Konzentration angegeben, bei der gerade kein Wachstum mehr feststellbar war.

18.2. Herstellung von Streptomycin- und Nalidixinsäure-resistenten Mutanten

Beide Resistenzen sind gut geeignet, um Zellen, die z.B. als Rezipienten verwendet werden sollen, zu markieren, ohne ihre übrigen Eigenschaften zu verän-

dern. Solche Mutanten können von beliebigen Bakterienstämmen als 1-Schritt-Spontanmutanten gewonnen werden.
Zur Isolierung solcher Mutanten wurden 10-50 ml Kulturen von den betreffenden Organismen in BHI-Medium angezogen. Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Zellen abzentrifugiert (600-7000 Upm) und in einem möglichst kleinen Volumen (100-1000 µl) Verdünnungspuffer resuspendiert. Von dieser Mischung wurden jeweils 100 µl auf Iso-Sensitest-Agar, dem 500 µg/ml Streptomycin bzw. 50 µg/ml Nalidixinsäure zugefügt worden waren, ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage lang bei 25°C oder 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit hatten sich etwa 10-20 Kolonien gebildet. Diese wurden isoliert und auf Platten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausgestrichen, um Reinkulturen zu gewinnen. Die so erhaltenen Mutanten wurden erneut auf ihre Resistenz hin überprüft, bevor sie auf Stammkulturagar überimpft wurden.

18.3. Isolierung von Konjuganten und Transformanten

Die bei Konjugations- bzw. Transformationsversuchen angelegten Selektivplatten wurden 2 Tage lang bei 25°C oder 37°C, je nach Versuchsbedingung, bebrütet. Hatten sich Kolonien gebildet, so mußten diese isoliert werden und auf die erworbenen Eigenschaften hin untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Löcher einer Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl frischer Nährlösung (LB oder BHI) gefüllt. Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern wurde nun jede zu übertragende Kolonie in ein Loch mit Nährbouillon übertragen. Nach einer Inkubationsdauer von 3 h hatte sich die Nährlösung getrübt. Die gewachsenen Kulturen wurden mit einem dafür konstruierten Stempel auf weitere Selektivmedien, sowie zur Kontrolle auf Vollmedien überimpft. Die Art des Stempels (Abb. 2) erlaubte es, 48 Kolonien im gleichen Muster auf Selektiv- und Vollmedien zu übertragen und zu testen.

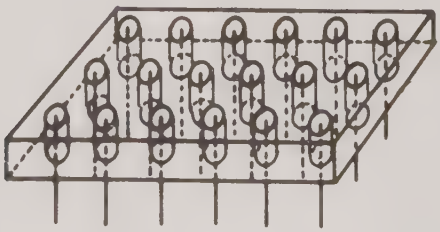


Abb. 2: Stempel zur Herstellung von Replikaplatten

19. Herkunft der Chemikalien

Boehringer, Mannheim	Restriktionsenzyme
Difco, Detroit	Agar, BHI-Medium
Flow, Meckenheim	RPMI-Medium
Marine Colloids, Rockland/Maine	Seakem Agarose
Merck, Darmstadt	Nährmedien, Chemikalien (p.a. und reinst.), Ribonuklease (aus Pankreas), Lysozym
Oxoid, Wesel	Nährmedien
Pharmacia, Uppsala	Sephadex G 50 (medium), Eichproteine
Serva, Mannheim	Chemikalien (p.a. oder reinst.), Biochemikalien
Fresenius, Bad Homburg	Y. enterocolitica-Antiserum O:3 und O:9

III. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

1. Koloniedimorphismus bei Y. enterocolitica

Es fiel auf, daß einige von Patienten isolierte Y. enterocolitica-Stämme auf Vollmedium (BAB oder TSA) zwei verschiedene Kolonietypen ausbildeten, wenn sie bei 37°C inkubiert wurden. Bei einer Bebrütungstemperatur von 25°C traten dagegen einheitliche Kolonieformen auf. Ebenso konnten bei Lebensmittelisolaten keine temperaturabhängigen Kolonievarianten beobachtet werden.
Die beiden Kolonietypen unterschieden sich zunächst vor allem in der Größe. Mit Hilfe einer Lupe konnte man erkennen, daß die kleineren Kolonien stärker gewölbt waren als die großen. Außerdem erschienen die großen, flachen Kolonien durchsichtiger als die kleinen. Bei manchen Stämmen (Serotyp O:8) zeigten die größeren Kolonien auch eine rauhere Oberfläche.
Wiederholtes Ausstreichen einzelner kleiner Kolonien führte stets zur Ausbildung beider Koloniearten, wenn die Inkubation bei 37°C erfolgte. Wurden dagegen große Kolonien ausplattiert, traten unabhängig von der Temperatur in der Regel nur große, flache Kolonien auf.

2. Plasmide in Y. enterocolitica

2.1. Plasmid-Screening

26 aus Patienten isolierte Y. enterocolitica-Stämme der Serotypen O:3, O:9 und O:8 sowie 8 aus Lebensmitteln isolierte Stämme wurden auf das Vorkommen extrachromosomaler DNA hin untersucht. Von den aus Schweinefleisch isolierten Stämmen gehörten 7 Stämme dem Serotyp 5A an, zwei Stämme waren nicht typisierbar (s. Tab. 3). Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lysis nach Birnboim und Doly angewandt (s. Material und Methoden). Vorversuche hatten gezeigt, daß diese Methode bei Y. enterocolitica deutliche Vorteile gegenüber der Methode nach Hansen und Olsen (1978) sowie der Methode nach Clewell und Helinski (Keness, 1980) hatte. Das Verfahren nach Birnboim und Doly erlaubte mit kürzerem Zeit- und Arbeitsaufwand die Herstellung sauberer Präparationen.

Zur Extraktion von Plasmid-DNA wurde von Einzelkolonien ausgegangen. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB überimpft und über Nacht bei 25°C bebrütet. Die weitere Isolation wurde wie in Material und Methoden beschrieben vorgenommen.
Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennungen sind in den Abbildungen 3-7 dargestellt.

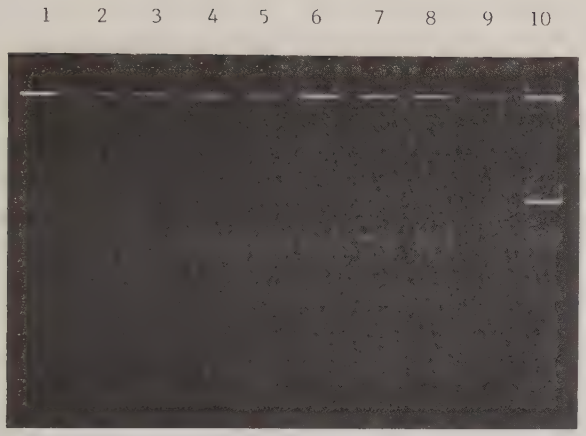


Abb. 3: Plasmide in Y. enterocolitica-Stämmen I
Spalte 1: Stamm 103; Spalte 2: Stamm 202; Spalte 3: Stamm 503; Spalte 4: Stamm 609; Spalte 5: Stamm 903; Spalte 6: Stamm 1203; Spalte 7: Stamm 1409; Spalte 8: Stamm 1503; Spalte 9: Stamm 1703 ; Spalte 10: Stamm 1603.

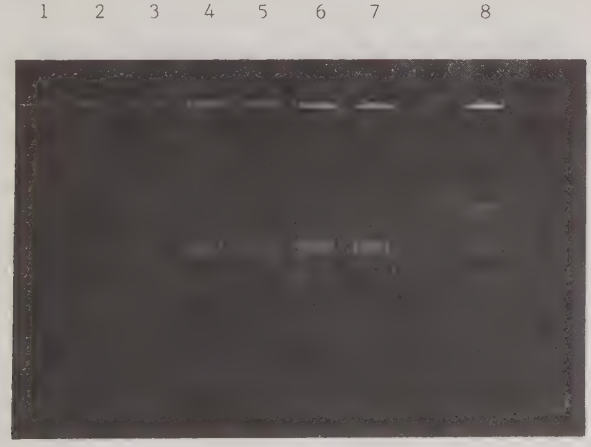


Abb. 4: Plasmide in Y. enterocolitica-Stämmen II
Spalte 1: Stamm 1909; Spalte 2: Stamm 2003; Spalte 3: Stamm 2103; Spalte 4: Stamm 2203; Spalte 5: Stamm 2309; Spalte 6: Stamm 2803; Spalte 7: Stamm 803; Spalte 8: Stamm 2403.

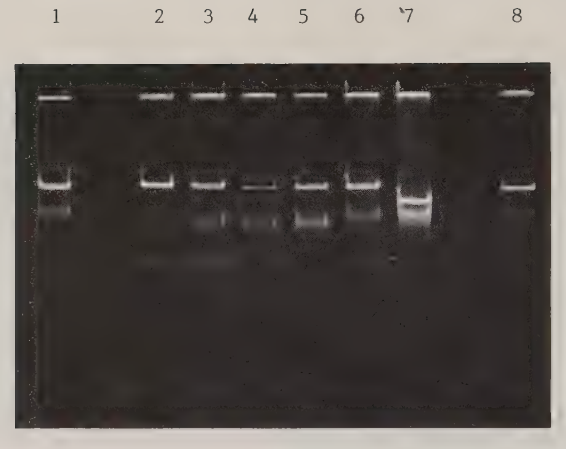


Abb. 5: Plasmide in Y. enterocolitica-Stämmen III
Spalte 1: Stamm WA 314; Spalte 2: Stamm 1803 ; Spalte 3: Stamm 303; Spalte 4: Stamm 703; Spalte 5: Stamm 1003; Spalte 6: Stamm MCH 628; Spalte 7: Plasmid pGC; Spalte 8: Stamm WA 314.

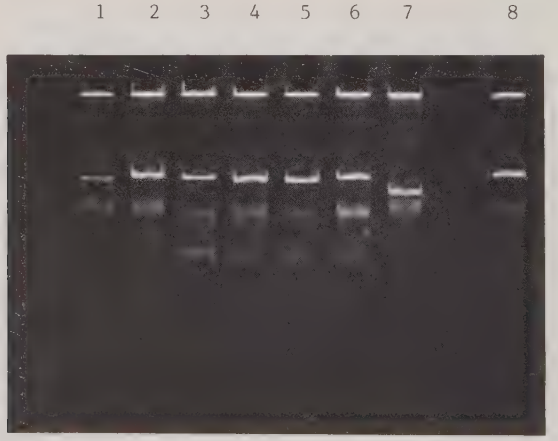


Abb: 6: Plasmide in Y. enterocolitica-Stämmen IV
Spalte 1: Stamm WA 314; Spalte 2: Stamm 1203; Spalte 3: Stamm 1803; Spalte 4: Stamm 2509; Spalte 5: Stamm 2609; Spalte 6: Stamm 2703; Spalte 7: Plasmid pGC; Spalte 8: Stamm MCH 628.

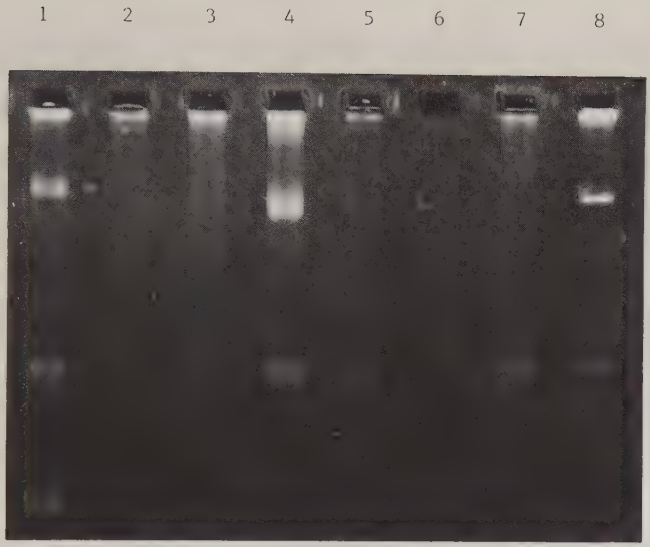


Abb. 7: Plasmide in Y. enterocolitica-Stämmen V
Spalte 1: Stamm B10; Spalte 2: Stamm B85A; Spalte 3: Stamm B225A; Spalte 4: Stamm B215A; Spalte 5: Stamm B25A; Spalte 6: Stamm B15A; Spalte 7: Stamm B115A; Spalte 8: Stamm F1.

2.2. Größenbestimmung der Plasmide (nach Meyers et al., 1976)

Die Größe der Plasmide von Y. enterocolitica wurde mit Hilfe von Plasmiden bekannter Größe auf Grund der Wanderungsstrecke im Gel ermittelt. Der log der Wanderungsstrecke wurde gegen den log der Teilchengröße aufgetragen. Die entstandene Gerade diente als Eichkurve. Als Eichplasmide dienten Plasmide folgender Größen: 123 Kb, 63 Kb und 69 Kb aus Y. enterocolitica WA 314, Serotyp O:8, und aus Y. enterocolitica MCH 628, Serotyp O:3, 49,5 Kb (pGC1), sowie 57 Kb, 30,9 Kb und 7,2 Kb aus E. coli-Stämmen.
Es zeigte sich, daß die Plasmidgröße der humanpathogenen Stämme spezifisch im Hinblick auf die einzelnen Serotypen war. Während Stamm WA 314, der Vertreter des Serotyps O:8, neben einem 123 Kb großen Plasmid ein 63 Kb großes Plasmid besaß, zeigten sämtliche untersuchten Stämme des Serotyps O:3 ein Plasmid mit einer Größe von 69 Kb. Die untersuchten Stämme des Serotyps O:9 hatten ein etwas kleineres Plasmid mit einer Größe von 66 Kb. Bei den Lebensmittelstämmen

zeigten die beiden Vertreter des Serotyps 5A, in denen extrachromosomale DNA vorhanden war, ebenfalls ein Plasmid gleicher Größe, während die Plasmide der übrigen Stämme in der Größe leicht voneinander abwichen. Bei diesen Stämmen war es allerdings fraglich, ob sie dem gleichen Serotyp angehörten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Bei Y. enterocolitica identifizierte Plasmide

Stamm	Serotyp	Plasmidgröße (Kb)	Herkunft
103	O:3	69	Mensch
303	O:3	69	Mensch
703	O:3	69	Mensch
1003	O:3	69	Mensch
1203	O:3	69	Mensch
1603	O:3	69	Mensch
1803	O:3	69	Mensch
2403	O:3	69	Mensch
2509	O:9	66	Mensch
2609	O:9	66	Mensch
2703	O:3	69	Mensch
B215A	5A	80	Schwein
B225A	5A	80	Schwein
B10	nt	76	Schwein
F1	nt	78	Schwein (Faeces)

nt= nicht typisierbar

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen einen Größenvergleich der Plasmide von Stämmen europäischer und amerikanischer Serotypen. Die Plasmidpräparationen der verschiedenen Serotypen wurden dazu ins gleiche Probenloch gefüllt und gemeinsam im Gel aufgetrennt.
Deutlich ist auf den Abbildungen der geringe Größenunterschied von 3 bzw. 6 Kb zwischen den Plasmiden des Serotyps O:3 und den Plasmiden der Serotypen O:9 und O:8 zu erkennen (Abb. 8, Spalten 2 und 3 sowie Abb. 9, Spalten 2 und 6). Interessant war es, daß die in Europa isolierten Organismen des Serotyps O:3 ein Plasmid mit offenbar der gleichen Größe aufwiesen wie der ursprünglich in Kanada isolierte Stamm MCH 628, der ebenfalls zum Serotyp O:3 gehörte (vgl. Abb. 8, Spalte 4 und Abb. 9, Spalte 4).

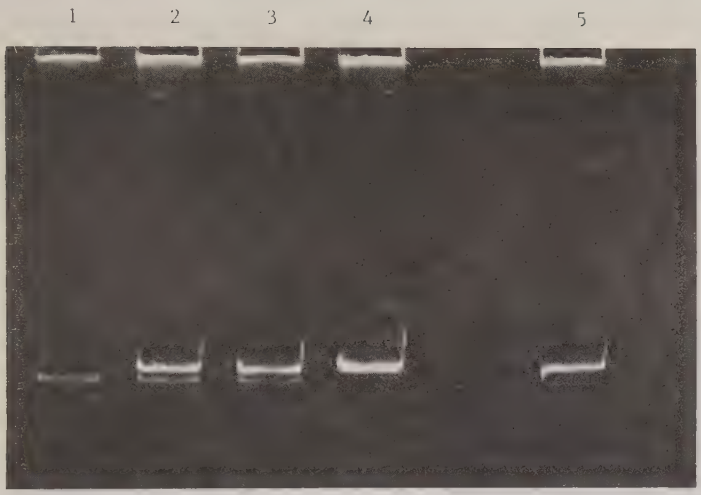


Abb. 8: Größenvergleich zwischen Plasmiden verschiedener Serotypen I
Spalte 1: WA 314; Spalte 2: WA 314 + MCH 628; Spalte 3: WA 314 + 1803; Spalte 4: MCH 628 + 1803; Spalte 5: MCH 628.

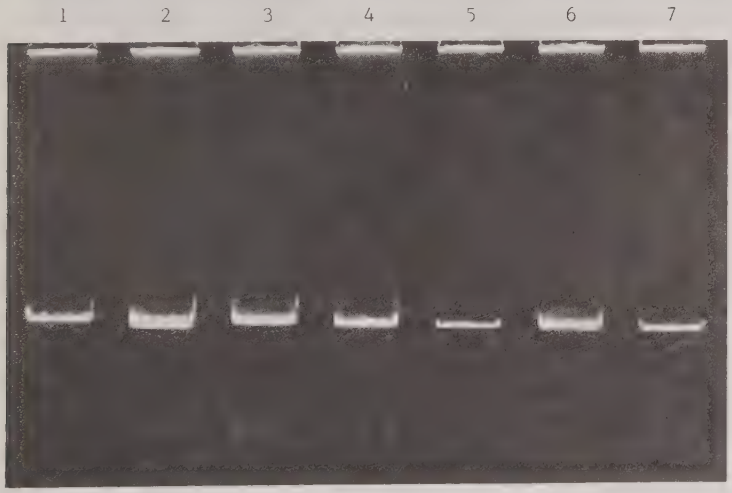


Abb. 9: Größenvergleich zwischen Plasmiden verschiedener Serotypen II
Spalte 1: 1803; Spalte 2: 1803 + 2609; Spalte 3: 1803 + 1003; Spalte 4: 1003 + MCH 628; Spalte 5: 1003; Spalte 6: 2609 + MCH 628; Spalte 7: 2609.

2.3. Vergleichende Charakterisierung der Yersinia-Plasmide mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Die Plasmid-DNA wurde wie in Material und Methoden beschrieben isoliert. Vor der Behandlung mit Restriktionsenzymen wurden 10-20 µl der DNA-Probe gelelektrophoretisch untersucht (s. Abb. 10 und Abb. 11). Dabei wurde der relative Gehalt an DNA auf Grund der Bandenstärke bestimmt.

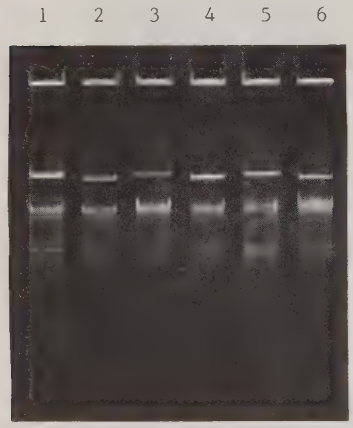


Abb. 10: Auftrennung der für die Verdauung mit Bam HI verwendeten DNA-Proben
Spalte 1: 2703, Serotyp O:3; Spalte 2: 2609, Serotyp O:9; Spalte 3: MCH 628, Serotyp O:3; Spalte 4: 2509, Serotyp O:9; Spalte 5: 1803, Serotyp O:3; Spalte 6: WA 314, Serotyp O:8.

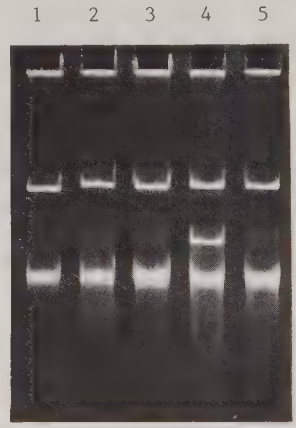


Abb. 11: Auftrennung der für die Verdauung mit Eco RI und Bam HI verwendeten DNA-Proben
Spalte 1: WA 314, Spalte 2: 1803; Spalte 3: 2609; Spalte 4: 2703*; Spalte 5: MCH 628.
* Der Stamm hatte ein extra Plasmid.

War die Plasmidbande zu dünn, wurde die DNA erneut gefällt und in einem kleineren Puffervolumen aufgenommen. Außerdem konnte bei solch einem Probegel der Kontaminationsgrad an chromosomaler DNA, RNA und Protein bestimmt werden und entschieden werden, ob eine weitere Reinigung der DNA erforderlich war.
In der Regel war jedoch nach drei Ethanolfällungen keine weitere Reinigung vor dem Einsatz von Restriktionsenzymen mehr nötig. Bei einigen Stämmen konnte jedoch ein besseres Ergebnis erzielt werden, wenn nach der ersten Ethanolfällung eine Phenolbehandlung durchgeführt wurde.

Untersucht wurden jeweils beispielhaft Plasmide der Serotypen O:3, O:8 und O:9. Als Längenstandard und zur Überprüfung der Restriktion wurde DNA des Phagen λ verwendet. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde an Hand der Wanderungsstrecke im Gel bestimmt.
Abb. 10 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der untersuchten Plasmide vor der Behandlung mit Restriktionsenzymen. Die Stärke der Banden war für eine Verdauung ausreichend.

2.3.1. Verdauung mit Bam HI

Diese DNA-Proben wurden vor der Verdauung mit Phenol gereinigt. Die im Agarose-Gel aufgetrennten Fragmente sind in Abbildung 12 zu sehen.

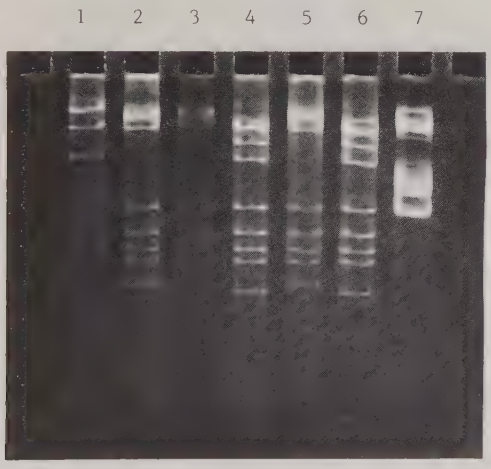


Abb. 12: Auftrennung der mit Bam HI verdauten Yersinia-Plasmide
Spalte 1: WA 314, Serotyp O:8; Spalte 2: 1803, Serotyp O:3; Spalte 3: 2703, Serotyp O:3; Spalte 4: 2609, Serotyp O:9; Spalte 7: λ-DNA (Referenz-DNA)

Die für die einzelnen Fragmente ermittelten Größen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Banden mit einer Größe unter 3 Kb waren nur sehr schwach ausgeprägt und sind auf der Abbildung möglicherweise schlecht zu sehen.

Tabelle 4: Größe der Bam HI-Fragmente von Y. enterocolitica-Plasmiden

Stamm	WA 314	1803	2703	2609	MCH 628	2509	λ*
Fragmentgröße	21,9	18,7	18,7	14,1	18,7	14,1	16,84
in Kb	14,1	17,0	17,0	13,8	17,0	13,8	7,23
	9,3	14,3	14,3	11,0	14,3	11,0	6,77
	5,8	5,8	5,8	8,9	5,8	8,9	6,52
	4,7	4,7	4,7	5,8	4,7	5,8	5,62
	4,0	4,0	4,0	4,7	4,0	4,7	5,50
	2,1	3,8	3,8	4,0	3,8	4,0	
		3,3	3,3	3,8	3,3	3,8	
		1,9	1,9	3,1	1,9	3,1	
		1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	

* Werte aus Boehringer, Genkarte des Phagen Lambda

2.3.2. Verdauung mit Eco RI

Abb. 11 zeigt wiederum die für die Restriktionsanalyse verwendeten DNA-Proben. Auffällig war die zusätzliche Bande bei Stamm 2703*, die in manchen Präparationen auftrat. Um ein Präparationsartefakt auszuschließen, wurde diese Variante ebenfalls mituntersucht.
Die nach der Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco RI erhaltenen Fragmente wurden wiederum gelelektrophoretisch untersucht und sind in Abb. 12 dargestellt.

Das Auftreten von zwei zusätzlichen Banden bei Stamm 2703* (verglichen mit den beiden Stämmen 1803 und MCH 628) ist ein Hinweis darauf, daß es sich bei der kleinen Bande nicht um ein Präparationsartefakt, sondern um ein weiteres Plasmid handelt. Bedeutung und Funktion dieses Plasmides sind noch unklar.
Fehlte das kleine Plasmid, so zeigte der Stamm das gleiche Schnittmuster wie die übrigen Vertreter des Serotyps O:3 (s. Abb. 15).

Die Größen der bei der Verdauung mit der Restriktionsendonuclease Eco RI entstandenen Fragmente sind in der Tabelle 5 aufgelistet.
Die beiden Fragmente, die von dem kleinen Plasmid stammten, wurden dabei extra aufgeführt.

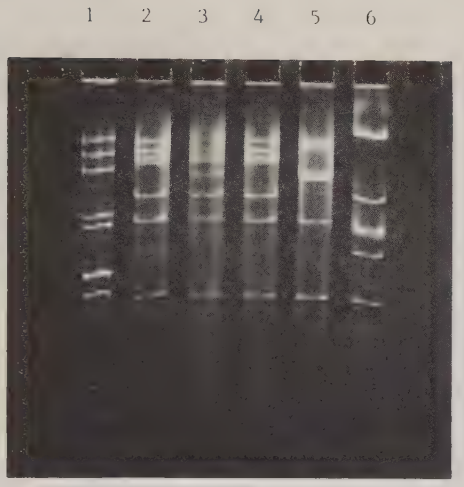


Abb. 13: Auftrennung der mit Eco RI verdauten Yersinia-Plasmide
Spalte 1: WA 314, Serotyp O:8; Spalte 2: 1803, Serotyp O:3; Spalte 3: 2703*, Serotyp O:3; Spalte 4: MCH 628, Serotyp O:3; Spalte 5: 2609, Serotyp O:9; Spalte 6: λ-DNA (Referenz-DNA)

Tabelle 5: Größe der Eco RI-Fragmente von Y. enterocolitica-Plasmiden

Stamm	WA 314	1803	2703*	MCH 628	2509	λ
Fragmentgröße	16,6	17,0	17,0	17,0	16,6	21,22
in Kb	12,5	14,1	14,1	14,1	15,5	7,42
	10,0	12,4	12,4	12,4	9,4	5,8
	6,2	11,5	11,5	11,5	9,2	5,6
	5,6	7,8	7,8	7,8	6,0	4,87
	4,0	6,1	6,1	6,1	3,6	3,53
	3,6	3,6	3,6	3,6	1,4	
	2,2	2,2	2,2	2,2		
	1,8	1,4	1,4	1,4		
	1,4					
kleines Plasmid			22,1			
von 2703*			9,6			

2.3.3. Verdauung mit Hind III

Zur Restriktionsanalyse mit dem Enzym Hind III wurde die gleiche DNA-Probe wie im vorherigen Versuch eingesetzt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abb. 14 wiedergegeben.
Bei Stamm 2703* traten auch hier zwei zusätzliche Banden auf. Die Plasmid-DNA von Stamm 1803 ist nur unvollständig verdaut. Daher treten neben den charakteristischen Fragmenten weitere Banden von Fragmenten auf, die noch nicht völlig voneinander getrennt sind.
Tabelle 6 zeigt die für die einzelnen Fragmente ermittelten Größen.

Tabelle 6: Größen der Hind III-Fragmente von Y. enterocolitica-Plasmiden

Stamm	WA 314	1803	2703*	MCH 628	2609	λ
Fragmentgröße	19,0	19,0	19,0	19,0	19,0	23,13
in Kb	8,3	12,5	12,5	12,5	12,5	9,42
	7,0	6,8	6,8	6,8	7,7	6,68
	5,6	6,3	6,3	6,3	5,4	4,36
	3,7	5,6	5,6	5,6	5,3	2,32
	3,6	3,7	3,7	3,7	3,7	2,03
	3,2	3,6	3,6	3,6	3,6	
	3,1	3,2	3,2	3,2	3,2	
	2,9	2,1	2,1	2,1	2,1	
	2,8	2,0	2,0	2,0	2,0	
	2,3	1,9	1,9	1,9	1,9	
	2,2	1,85	1,85	1,85	1,85	
		1,4	1,4	1,4	1,4	
kleines Plasmid			17,4			
von 2703*			14,1			

Die Restriktionsanalysen mit den Enzymen Eco RI, Bam HI und Hind III zeigten, daß die Plasmide eines Serotyps nicht nur die gleiche Größe, sondern auch identische Schnittmuster für die getesteten Restriktionsenzyme aufwiesen.
Weiterhin läßt die Vielzahl von gleichen und ähnlichen Fragmenten bei den Plasmiden der Serotypen O:3 und O:9, die vor allem nach dem Einwirken der Restriktionsendonukleasen Hind III und Bam HI zu finden waren, auf eine enge Verwandtschaft dieser beiden Plasmide schließen.
Erstaunlich hoch sind auch die Übereinstimmungen mit dem Plasmid des Serotyps O:8.

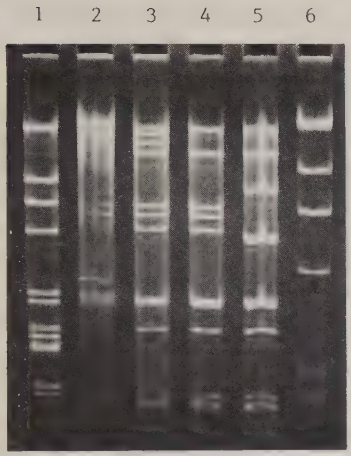


Abb. 14 Auftrennung der mit Hind III entstandenen Fragmente
Spalte 1: WA 314, Serotyp O:8; Spalte 2: 1803, Serotyp O:3; Spalte 3: 2703*, Serotyp O:3; Spalte 4: MCH 628, Serotyp O:3; Spalte 5: 2609, Serotyp O:9; Spalte 6: λ-DNA (Referenz-DNA).

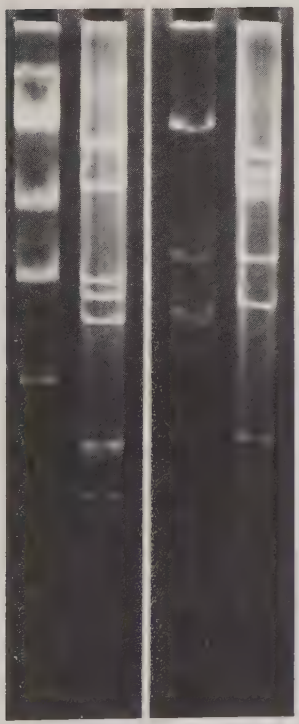


Abb. 15: Schnittmuster für Stamm 2703 in Abwesenheit des kleinen Plasmides
Spalte 1: λ-DNA verdaut mit Hind III;
Spalte 2: 2703 geschnitten mit Hind III;
Spalte 3: λ-DNA verdaut mit Eco RI;
Spalte 4: 2703 verdaut mit Eco RI.

3. Eigenschaften, die in Abhängigkeit von den 66-69 Kb großen Plasmiden auftreten

Ziel der Untersuchung war es zunächst, ein Testverfahren zu finden, mit dessen Hilfe schnell und ohne Plasmidisolierung zwischen plasmidhaltigen und plasmidlosen Zellen unterschieden werden konnte. Der Test sollte einfach durchführbar und in kurzer Zeit auswertbar sein. Dabei sollte ermittelt werden, ob Eigenschaften, die auch als Selektionsmerkmale in Frage kommen könnten, wie Antibiotikaresistenzen oder die Verwertung von Kohlenhydraten, in Verbindung mit diesen Plasmiden auftreten. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Plasmide auf die Virulenz der Stämme ausübten.

3.1. Ausbildung unterschiedlicher Kolonieformen

Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus der Plasmiduntersuchung war aufgefallen, daß die Stämme, die extrachromosomale DNA enthielten, bei 37°C auf TSA die bereits erwähnte Aufsplittung in große flache und kleine gewölbte Kolonien zeigten. Eine eingehendere Untersuchung deckte auf, daß die großen flachen Kolonien ihre Plasmide verloren hatten. Dies galt jedoch nur für die Stämme der Serotypen O:3, O:8 und O:9. Die aus Lebensmittel isolierten Stämme mit dem Serotyp 5A oder nicht typisierbare Stämme bildeten, unabhängig von ihrem Plasmidgehalt, nur große Kolonieformen aus.

3.2. Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika bei plasmidhaltigen und plasmidlosen Stämmen

Insgesamt wurden 26 Antibiotika untersucht. Dabei wurden vor allem solche überprüft, gegen die Resistenzen bei Y. enterocolitica aufgetreten waren (Kimura et al., 1976). Da in vorangegangenen Untersuchungen (Cornelis et al., 1973; Cornelis und Abraham, 1975; Hauröder, 1980) vornehmlich Unempfindlichkeiten gegenüber ß-Lactam-Antibiotika beobachtet worden waren, wurden solche Verbindungen besonders berücksichtigt. Der Test wurde mit Hilfe von Antibiotika-Testplättchen im Agardiffusionstest durchgeführt. Es wurden je ein plasmidtragender Stamm mit der entsprechenden plasmidfreien Mutante der Serotypen O:3 und O:9 eingesetzt. Folgende Antibiotika wurden verwendet: Cefaloridin, Cephalothin, Carbenicillin, Penicillin G, Ampicillin, Chloramphenicol, Piperacillin, Oxacillin, Fusidinsäure, Moxalactam, Methicillin, Azlocillin, Ticarcillin, Nalidixinsäure, Cefalexin, Cefazolin, Cefoxitin, Tetracyclin, Kanamycin, Tobramycin, Trimethoprim, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Streptomycin, Gentamycin, Propicillin, Cephotaxim.

Bei keinem der untersuchten Hemmstoffe war bei Verlust des Plasmides eine Zunahme der Empfindlichkeit oder gar ein Verlust der Resistenz feststellbar. Es konnten keine Hinweise auf eine plasmidbedingte Resistenz gefunden werden.

3.3. Verwertung von Kohlenhydraten bei plasmidhaltigen und plasmidfreien Stämmen

Es wurden je ein Vertreter der Serotypen O:3 und O:9 sowie die entsprechenden plasmidfreien Mutanten dieser Stämme untersucht. Bei den getesteten Kohlenhydraten Rhamnose, Raffinose, Melibiose, Cellobiose, Maltose, α-Methylpyranoside, Lactose, Xylose, Saccharose, Salicin, Sorbose, Sorbit und Trehalose konnten keine Unterschiede zwischen Stämmen mit Plasmid und ohne Plasmid festgestellt werden.

3.4. Calciumbedürftigkeit bei Stämmen mit und ohne Plasmid

Bereits für Y. pestis war beschrieben worden, daß die Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C auf die Zufuhr von Ca^{2+}-Ionen angewiesen sind (Higuchi et al., 1959; Higuchi und Smith, 1961; Brubaker und Surgalla, 1964; Brubaker, 1972). Dies traf nur für virulente Stämme zu. Auch bei Y. enterocolitica-Stämmen des Serotyps O:8 war eine solche temperaturabhängige Calciumbedürftigkeit beobachtet und in einen Zusammenhang mit dem 63 Kb-Plasmid gebracht worden (Gemski et al., 1980).
Es sollte nun untersucht werden, ob die in Bonn aus Patienten und Lebensmitteln isolierten Stämme ein ähnliches Verhalten zeigten.

3.4.1. Plattentest

Der Versuch wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 16 und 17 veranschaulicht und in den Tabellen 7, 8 und 9 zusammengefaßt.
Wurden geeignete Verdünnungstufen von plasmidlosen Stämmen auf Vollmedium (BAB) und calciumdefizienten Medium (MGOX) ausplattiert, so wuchsen innerhalb von 24 Stunden bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C auf beiden Medien etwa gleich viele Kolonien (s. Tabelle 7). Plasmidtragende Stämme zeigten dagegen nur auf dem Vollmedium eine normale Koloniebildung. Auf MGOX-Agar war bei einer Inkubationstemperatur von 37°C innerhalb von 24 Stunden kein Wachstum feststellbar, oder die Kolonien wuchsen so klein, daß sie mit bloßem Auge kaum sichtbar waren (s. Tabelle 7). Bei einigen Stämmen traten auf den MGOX-Agarplatten vereinzelt große Kolonien auf, die, wie sich zeigte, das Plasmid verloren hatten (vgl. Abb. 16). Auf diese Weise war es leicht möglich, plasmidfreie Mutanten zu isolieren.

Abb. 16: Wachstum auf MGOX-Agar
Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C wuchsen innerhalb von 18 h nur wenige Kolonien. Diese Kolonien waren nicht Ca^{2+}-bedürftig.

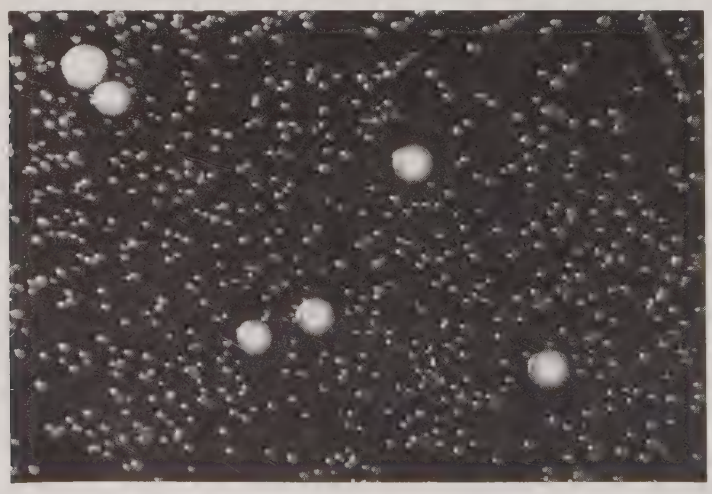


Abb. 17: Wachstum auf MGOX-Agar
Dieselbe MGOX-Platte nach einer Weiterbebrütung bei 25°C. Innerhalb von 18 h sind viele kleine Ca^{2+}-bedürftige Kolonien nachgewachsen.

Wurden die bei 37°C auf MGOX-Agar gewachsenen Kolonien markiert und die Platten bei 25°C weiter bebrütet, bildeten sich ähnlich viele Kolonien wie auf dem gleichzeitig beimpften Vollmedium aus (vgl. Abb. 16 und 17).
Betrug die Inkubationstemperatur während des gesamten Versuchszeitraumes 25°-26°C, so trat keine Calciumabhängigkeit auf. Auf beiden Nährmedien (BAB und MGOX) bildeten sich annähernd gleich viele Kolonien aus (vgl. Tabellen 7 und 8). Bei allen untersuchten Patientenstämmen korrelierte die Anwesenheit des 66 bzw. 69 Kb-Plasmides mit der Ausprägung der Calciumbedürftigkeit bei 37°C (vgl. Tabelle 9). Wie die Untersuchung isogener Paare zeigte, ging mit dem Verlust des Plasmides auch die Calciumabhängigkeit verloren (s. Tabelle 8). Bei den Lebensmittelstämmen konnte kein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit eines Plasmides und einem essentiellen Bedarf an Ca^{2+}-Ionen festgestellt werden. Diese Stämme waren nicht auf die Zufuhr von Calcium angewiesen.

Tabelle 7: Anzahl der KBE auf Vollmedium (BAB) und Calciummangelmedium (MGOX) bei 25°C und 37°C

Stamm	BAB		MGOX		Ca^{2+}-bedürftig
	37°C	25°C	37°C	25°C*	
103	40	40	0	+ 38	ja
203	152	152	142	+ 0	nein
303	115	115	6	+ 75	ja
403	55	55	43	+ 3	nein
503	24	24	26	+ 0	nein
609	42	42	41	+ 0	nein
803	40	40	40	+ 0	nein
1803	60	60	4	+ 52	ja
2404	45	45	4	+ 30	ja
2509	149	149	7	+172	ja
2609	69	69	3	+ 53	ja
2703	184	184	53	+102	ja
2803	88	88	35	+ 0	nein

* gezählt wurden Kolonien, die nach einer Weiterbebrütung bei 25°C zusätzlich gebildet worden waren.

Tabelle 8: Verhalten von isogenen Paaren auf MGOX-Agar und BAB-Agar bei 25° und 37°C

		Stamm				Plasmide in			
		1803^+	1803^-	2509^+	2509^-	1803^+	1803^-	2509^+	2609^-
37°C	BAB	60	63	74	94				
	MGOX	0	57	0	80				
25°C	BAB	60	64	74	94				
	MGOX	50	57	79	80				

Tabelle 9: Korrelation zwischen der Anwesenheit von Plasmiden und der Ca^{2+}-Bedürftigkeit bei Patientenstämmen und Lebensmittelstämmen

Stamm	Ca^{2+}-bedürftig	Plasmid	Stamm	Ca^{2+}-bedürftig	Plasmid
103	+	+	2003	–	–
203	–	–	2109	–	–
303	+	+	2203	–	–
403	–	–	2309	–	–
503	–	–	2403	+	+
609	–	–	2509	+	+
703	+	+	2609	+	+
803	–	–	2703	+	+
903	–	–	2803	–	–
1003	+	+	B15A	–	–
1203	+	+	B115A	–	–
1409	–	–	B25A	–	–
1509	–	–	B215A	–	+
1603	+	+	B225A	–	+
1703	–	–	B85A	–	–
1803	+	+	B10	–	+
1909	–	–	F1	–	+

3.4.2. Wachstum unter Calciummangelbedingungen

Die Ergebnisse des vorherigen Versuches deuteten bereits darauf hin, daß bei

einer Inkubationstemperatur von 37°C in calciumdefizientem Medium eine Wachstumshemmung bei plasmidführenden Stämmen auftritt. Dieser Effekt sollte im folgenden näher untersucht werden. Für diese Versuche wurden isogene Paare eines Stammes benutzt, bei dem die Calciumabhängigkeit besonders stark ausgeprägt auftrat. Plasmidlose und plasmidhaltige Paare wurden von MGOX-Agar isoliert.
Je eine Kolonie eines plasmidtragenden und eines plasmidfreien Stammes wurde in 5 ml Flüssigmedium (BHI) inokuliert und über Nacht bei 25°–26°C bebrütet. Am folgenden Tag wurden 0,2 ml dieser Vorkultur zum Beimpfen der Hauptkultur (20 ml) verwendet (Verdünnung 1:100). Dem Medium für die Hauptkultur (BHI) waren 20 mM Natriumoxalat und 20 mM $MgCl_2$ zugefügt worden, um ein calciumfreies Milieu zu erzeugen. Die Hauptkultur wurde zunächst 3 Stunden lang bei 25°C geschüttelt. Anschließend wurde unter Schütteln weiterinkubiert. Zu Beginn des Versuches (nach dem Animpfen), nach 3stündiger Inkubation bei 25°C sowie 3, 6, 8 und 19 Stunden nach dem Temperaturwechsel (auf 37°C) wurden Proben genommen und in geeigneten Verdünnungsstufen auf Vollmedium ausplattiert.

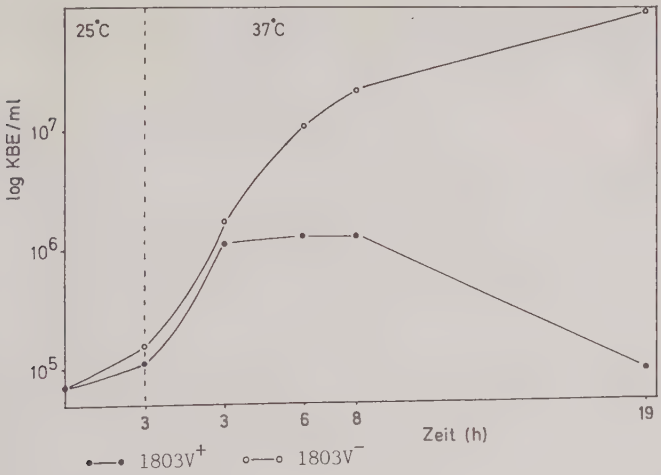


Abb. 18: Wachstumsverhalten vom plasmidführenden Stamm 1803^+ und der plasmidnegativen Mutante 1803^- in Calciummangelmedium

Wie aus Abb. 18 ersichtlich ist, verdoppelten sich der plasmidführende und der

plasmidfreie Stamm zunächst mit ähnlicher Geschwindigkeit. Auch nach dem Temperaturwechsel auf 37°C verliefen die beiden Wachstumskurven über einen Zeitraum von 3 Stunden parallel. Danach sank die Wachstumsrate des plasmidführenden Stammes 1803^{+} drastisch ab, es fand keine weitere Verdopplung mehr statt, während die plasmidlose Mutante ein normales Wachstumsverhalten aufwies.
Der Verlauf der Wachstumskurven deutet darauf hin, daß Stämme, die das 66 bzw. 69 Kb große Plasmid besitzen, unter den gewählten Kulturbedingungen noch 2 bis 3 Teilungszyklen durchlaufen und dann vorzeitig in die stationäre Wachstumsphase eintreten. Nach 19 Stunden war bei Stamm 1803^{+} bereits eine deutliche Reduktion der Lebendzellzahl feststellbar, d.h. die Bakterien befanden sich in der Absterbephase, wohingegen die Zellen von Stamm 1803^{-} nach dieser Zeit die stationäre Phase erreicht hatten.

3.4.2.1. Einfluß von Spontanmutanten

Aus Versuch 3.4.1. war bereits hervorgegangen, daß unter Calciummangelbedingungen bei nahezu allen Stämmen Spontanmutanten auftreten, die Plasmid und Calciumabhängigkeit verloren haben. Es sollte nun untersucht werden, ob und in welchem Umfang solche Mutanten die gefundenen Ergebnisse beeinflussen.
Wie in Versuch 3.4.1. gezeigt wurde, konnten plasmidhaltige Stämme von ihren plasmidlosen Mutanten auf Grund ihres Wachstumsverhaltens auf MGOX-Agar unterschieden werden. Der Versuch wurde wie oben beschrieben wiederholt, jedoch wurden diesmal Proben des Stammes 1803^{+} auf Vollmedium (TSA) und MGOX-Agar ausplattiert. Beide Platten wurden bei 37°C bebrütet.
Wie Abb. 19 zu entnehmen ist, konnte das Auftreten von Mutanten, die nicht calciumbedürftig waren, erstmals 6 Stunden nach dem Temperaturwechsel nachgewiesen werden. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl betrug nach 8 Stunden bei 37°C ca. 3 %. Nach 19 Stunden war die Anzahl der Mutanten gleich der Gesamtzellzahl, d.h. die Zellpopulation bestand fast nur noch aus plasmidfreien Mutanten. Da die absolute Zellzahl der Mutanten sich nur sehr gering erhöht hatte, muß die reale Absterbekurve für den plasmidführenden Stamm steiler als in Abb. 18 verlaufen (s. Abb. 20).
In einer calciumdefizienten Übernachtkultur, die bei 37°C inkubiert worden ist, hätten demnach die meisten Zellen das Plasmid verloren.

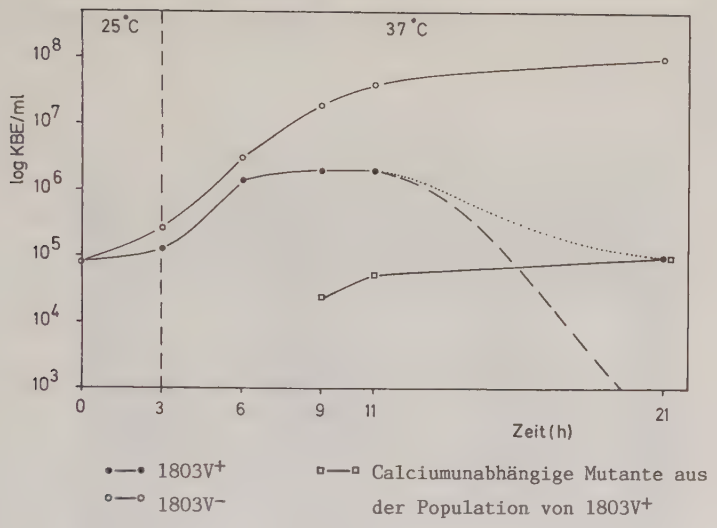


Abb. 19: Wachstumsverhalten von Stämmen mit und ohne Plasmid in Calciummangelmedium unter Berücksichtigung von Spontanmutanten

3.5. Fähigkeit zur Autoagglutination

Es war aufgefallen, daß einige der Stämme (1803, 103, 2509, 2609), wenn sie bei 37°C in LB angezogen wurden, einen flockigen Bodensatz im Reagenzglas bildeten, der Überstand aber klar blieb. Betrug die Inkubationstemperatur 25° bis 26°C, oder erfolgte die Anzucht in BHI, war die Nährlösung dagegen homogen getrübt (vgl. Abb. 20).

Laird und Cavanaugh (1980) fanden für die Stämme des Serotyps O:8 eine hohe Korrelation zwischen der Virulenz der Stämme und der Fähigkeit zur Autoagglutination. Die Autoren hatten die Autoagglutination in einem Minimalsalzmedium, das für Zellkulturen benutzt wird (RPMI), festgestellt. Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß Stämme, die in dem Zellkulturmedium autoagglutinierten, dazu auch in LB (ohne Zusatz von Kohlenhydraten) fähig waren. Die Versuche wurden daher im folgenden mit LB durchgeführt.

Patientenstämme und Lebensmittelstämme wurden wie in Material und Methoden beschrieben untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß eine Autoagglutination nur bei plasmidhaltigen Stämmen und nur bei einer Inkubationstemperatur von 37°C

auftrat. Diese Stämme zeigten einen diffusen, grobscholligen Bodensatz. Bei Stämmen ohne Plasmid trat eine gleichmäßige, homogene Trübung der Nährlösung auf. Eventuell vorhandene Bodensätze hatten sich punktförmig in der Mitte des Röhrchenbodens gebildet (s. Abb. 20).

Es bestand eine 100%ige Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Autoagglutination und der Anwesenheit des 66 bzw. 69 Kb großen Plasmides. Bei den Lebensmittelstämmen, die andere Plasmide beherbergten, war eine solche Übereinstimmung nicht nachweisbar. Einige dieser Stämme autoagglutinierten ohne erkennbare Systematik spontan, andere zeigten keine Autoagglutination. Die Ergebnisse für die einzelnen Stämme sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Autoagglutination und dem Auftreten des 66 bzw. 69 Kb großen Plasmid

Stamm	Autoagglutination	66/69 Kb Plasmid	Stamm	Autoagglutination	66/69 Kb Plasmid
103	+	+	2003	-	-
203	-	-	2109	-	-
303	+	+	2203	-	-
403	-	-	2309	-	-
503	-	-	2403	+	+
609	-	-	2509	+	+
703	+	+	2609	+	+
803	-	-	2703	+	+
903	-	-	2803	-	-
1003	+	+	B15A	-	-
1203	+	+	B115A	-	-
1403	-	-	B25A	-	-
1509	-	-	B215A	-	-
1603	-	-	B225A	-	-
1703	-	-	B85A	-	-
1803	+	+	B10	-	-
1903	-	-	F1	-	-

Da der Test sehr einfach durchführbar war und eine hohe Übereinstimmung mit der Anwesenheit des Plasmides besaß, wurde er zusammen mit dem Nachweis des Kolo-

niedimorphismusses als Standardtest zur Überprüfung plasmidtragender Stämme bzw. deren plasmidloser Mutanten benutzt.

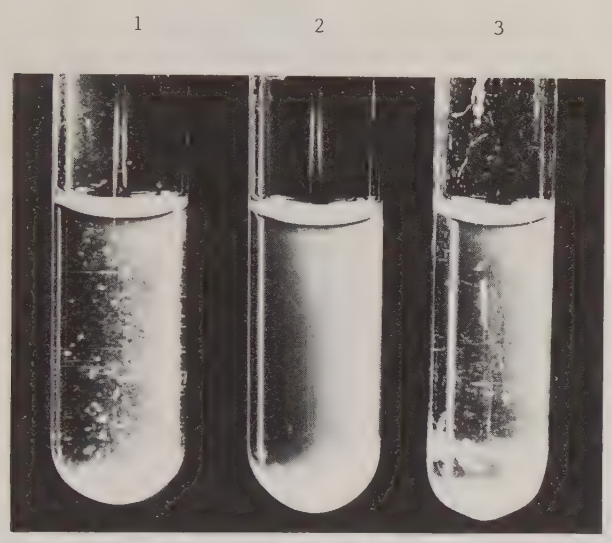


Abb. 20: Temperaturabhängige Fähigkeit zur Autoagglutination bei Stämmen mit dem 66 bzw. 69 Kb großen Plasmid
Röhrchen 1: 1803^{+}; Röhrchen 2: 1803^{-}; Röhrchen 3: 2509^{+}.
Die Kulturen waren über Nacht bei 37°C in LB angezogen worden.

3.6. Empfindlichkeit gegenüber menschlichem Serum

Wie bereits in den vorhergehenden Versuchen wurde auch bei diesem mit isogenen Paaren gearbeitet. Das Vorhandensein des Plasmides wurde vor Beginn des Experimentes gelelektrophoretisch überprüft. Der Test wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen die Ergebnisse für die plasmidtragenden Stämme $1803V^{+}$ und $103V^{+}$ sowie für deren plasmidfreie Mutanten $1803V^{-}$ und $103V^{-}$.
Ohne das Plasmid starben die Stämme bereits nach kurzer Zeit ab. Die Anzahl der KBE der plasmidführenden Stämme blieb dagegen nach anfänglicher Reduktion um eine halbe Zehnerpotenz über die gesamte Versuchsdauer konstant. Offenbar sind

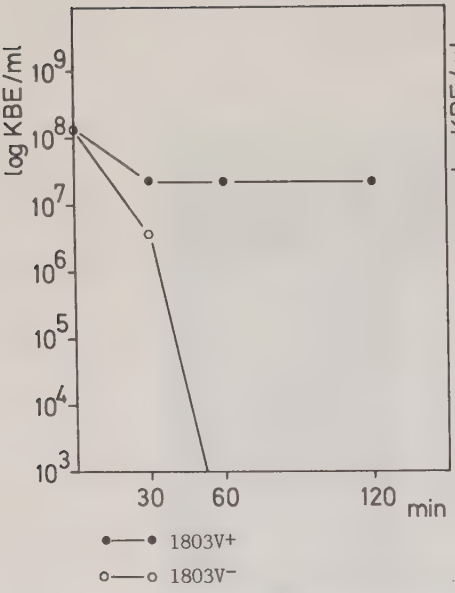


Abb. 21: Verhalten der Stämme $1803V^+$* und $1803V^-$ gegenüber Humanserum

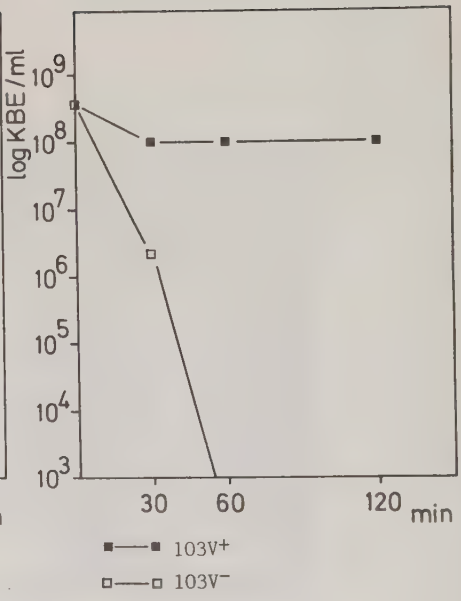


Abb. 22: Verhalten der Stämme $103V^+$ und $103V^-$ gegenüber Humanserum

* Da es sich gezeigt hatte, daß das 66 bzw. 69 Kb große Plasmid offenbar im Zusammenhang mit Virulenzeigenschaften auftrat, wurden Stämme, die diese Plasmide trugen, mit V^+ gekennzeichnet.

die Zellen, die das 69 Kb große Plasmid tragen, gegen die Vernichtung durch das im Serum aktive Komplementsystem geschützt.
Eine Erklärung für das geringfügige Absinken der Zellzahlen von $1803V^+$ und $103V^+$ könnte in einem Absterben plasmidfreier Mutanten in dieser Zeit gesehen werden.

3.7. Virulenz gegenüber Mäusen

3.7.1. Reaktionen auf intraperitoneale Injektion von Bakterien

Insgesamt wurden 7 isogene Paare getestet (s. Tabelle 11). Die Teststämme wurden unmittelbar vor dem Versuch auf die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Plas-

mides hin überprüft. Für jeden Stamm wurden drei Tiere verwendet. Jeder Maus wurden 0,5 ml Nährbouillon (LB) mit Y. enterocolitica intraperitoneal injiziert. Die Animpfmengen können aus Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Intraperitoneal verabreichte Stämme und Dosen

Stamm	Inoculum	Stamm	Inoculum
$303V^+$	1×10^8	$303V^-$	2×10^8
$1203V^+$	1×10^8	$1203V^-$	2×10^8
$1803V^+$	1×10^8	$1803V^-$	3×10^8
$2509V^+$	1×10^8	$2509V^-$	2×10^8
$2609V^+$	1×10^8	$2609V^-$	2×10^8
MCH 628^+	1×10^8	MCH 628^-	3×10^8
WA 314^+	1×10^8	WA 314^-	2×10^8

Die Tiere wurden mit Wasser und Futter versorgt und täglich auf äußerlich erkennbare Krankheitssymptome hin untersucht. Nach 2 Tagen bekamen 2 von 3 der mit Stamm WA 314^+ infizierten Tiere ein struppiges Fell. Das Verhalten dieser Tiere wurde auffällig unruhig und aggressiv. Am 4. Tag starb die erste Maus. Das dritte Tier in diesem Käfig wies nun ebenfalls deutliche Erkrankungsmerkmale auf (struppiges Fell, Unruhe, Aggression). Die beiden letzten der mit Stamm WA 314^+ beimpften Tiere starben nach 6 bzw. 8 Tagen. Alle übrigen Mäuse überlebten während einer Versuchsdauer von 14 Tagen. Bei diesen Tieren waren keine erkennbaren Krankheitssymptome oder Anzeichen von Unwohlsein aufgetreten.

3.7.2. Kolonisierungstest im Maus-Diarrhöe-Modell

Da virulente Stämme (Isolate von Patienten) von Y. enterocolitica, mit Ausnahme des zum Serotyp O:8 gehörenden Stammes WA 314, Mäuse nicht abtöteten, wurde untersucht, ob bei anderen Serotypen schwächere Symptome wie z.B. Diarrhöen nachweisbar sind, oder ob die Bakterien zur Kolonisation im Tier fähig sind.
Die Versuchsbedingungen sind im Methodenteil aufgeführt. Zunächst wurden den Tieren nur plasmidbeherbergende Stämme verabreicht. Während der ersten 4 Tage wurden täglich, später in Abständen von 2-4 Tagen Faecesproben von jedem Tier entnommen, auf ihre Konsistenz hin untersucht und auf Mac Conkey-Agar ausgestrichen. Die erste Identifizierung von Y. enterocolitica erfolgte auf Grund koloniemorphologischer Kriterien. Zusätzlich wurden ständig Reisolate gewonnen und auf ihre Fähigkeit zur Autoagglutination sowie auf die Anwesenheit des für

die Stämme charakteristischen Plasmides hin überprüft. Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 12 dargelegt.

Tabelle 12: Protokoll des Kolonisationstestes

Stamm	Serotyp	Diarrhöe/ weicher Kot	Nachweis von Bakterien (d)	Tod	andere Symptome
WA 314^{+}	O:8	+*	bis Tod	+	Unruhe, struppiges Fell
1803V^{+}	O:3	+	21	-	"Verstopfung"**
103V^{+}	O:3	+	16	-	"
1003V^{+}	O:3	+	21	-	"
2509V^{+}	O:9	+	21	-	"
2609V^{+}	O:9	+	21	-	"
2703V^{+}	O:3	+	21	-	"
MCH 628^{+}	O:3	+	21	-	"
Kontrolle	-	-	-	-	-

* Die Diarrhöe bzw. ein breiig-weicher Stuhl waren Symptome, die meist nur vorübergehend zwischen dem 3. und 8. Tag auftraten und daher leicht übersehen werden konnten. In seltenen Fällen blieb der Kot über 14 Tage hin weich.
** Alle Tiere hatten vorübergehend Schwierigkeiten, Kot abzugeben. Dies wurde auf eine deutliche Vergrößerung des Faecesvolumens infolge Wasseraufnahme zurückgeführt.

Die Tiere reagierten unterschiedlich auf die verschiedenen Serotypen. Am deutlichsten zeigte sich dies bei Stamm WA 314. Die Tiere starben auch nach oraler Verabreichung dieses Stammes ab. Wie schon im vorhergehenden Versuch trat auch diesmal etwa 2 Tage vor dem Tod eine merkliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes (Unruhe, struppiges Fell, Aggressivität) auf. Im Unterschied zur intraperitonealen Infektion trat der Tod nach peroraler Gabe der Bakterien jedoch später ein. Zwei von drei Mäusen starben nach 14 Tagen, das dritte Tier folgte am 15. Tag.
Erwartungsgemäß töteten die Stämme der Serotypen O:3 und O:9 die Tiere nicht ab, doch konnte bei fast allen Versuchstieren etwa ab dem 3. Tag eine vorübergehende Veränderung der Faecesbeschaffenheit festgestellt werden. Die Kotproben wurden, verglichen mit denen der Kontrolltiere, weicher und voluminöser. Die Stämme des Serotyps O:9 verursachten kurzfristig einen wässrig-breiigen Kot.

Gleichzeitig hatten die Tiere Schwierigkeiten, Faeces abzugeben. Die Bauchpartien waren geschwollen und druckempfindlich. Diese Symptome klangen bei den meisten Tiere 3-8 Tage nach ihrem Auftreten wieder ab.
Alle getesteten Stämme wurden während der gesamten Versuchsdauer, d.h. auch noch nach dem Verschwinden der oben erwähnten Begleitsymptome, von den Tieren ausgeschieden. Eine Ausnahme bildete lediglich der Stamm $103V^+$, Serotyp O:3. Dieser Stamm war über 16 Tage im Kot der Tiere nachweisbar. Die Kontrolltiere schieden Y. enterocolitica oder ähnliche Bakterien nicht aus.

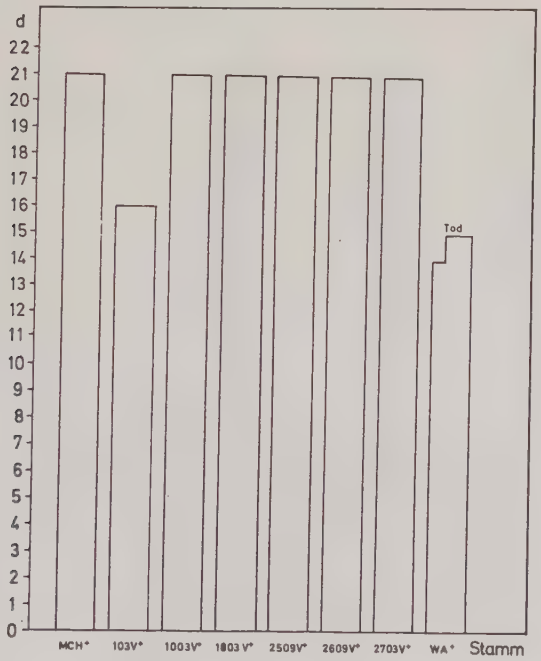


Abb. 23: Kolonisierungsvermögen von Y. enterocolitica-Stämmen in Mäusen
Ein Balken steht jeweils für 3 Mäuse. Abstufungen kommen durch das individuelle Verhalten einzelner Tiere zustande.

3.7.3. Verhalten isogener Paare im Maus-Diarrhöe-Modell

Der Versuch wurde mit drei isogenen Paaren durchgeführt, die sich nur im Besitz des Plasmides voneinander unterschieden. Es sollte geklärt werden, ob die beobachteten Symptome eine natürliche Reaktion der Tiere auf körperfremde Bakterien darstellten, oder ob dem Plasmid hier eine entscheidende Bedeutung zukäme. Die im Test eingesetzten Stämme waren vor Testbeginn wiederum sorgfältig auf die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des entsprechenden Plasmides hin überprüft worden. Die Dauer des Versuches erstreckte sich über 18 Tage (s. Abb. 24).

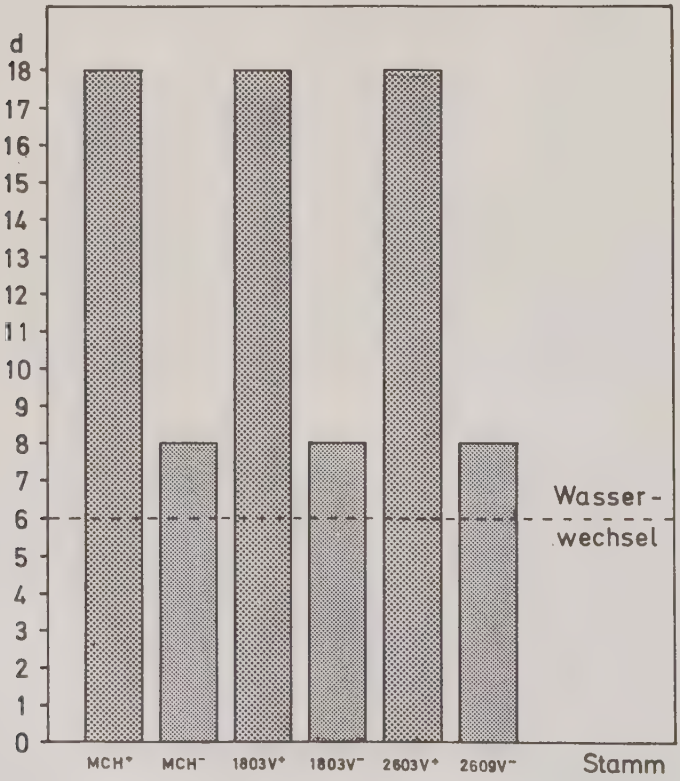


Abb. 24: Nachweis von Y. enterocolitica im Kot von Mäusen.
Ein Balken steht für jeweils 3 Tiere.

Tabelle 13: Verhalten isogener Paare im Tierversuch

Stamm	Serotyp	Plasmid	Diarrhöe/ weicher Kot	Verstopfung*	Kolonisierung
1803V$^+$	O:3	+	+	+	+
1803V$^-$	O:3	-	-	-	-
MCH 628$^+$	O:3	+	+	+	+
MCH 628$^-$	O:3	-	-	-	-
2609V$^+$	O:9	+	+	+	+
2609V$^-$	O:9	-	-	-	-

* Die Tiere hatten Schwierigkeiten, Kot abzugeben.

Wie aus Tabelle 13 entnommen werden kann, traten bei den Stämmen, die das 66 bzw. 69 Kb große Plasmid hatten, die gleichen Symptome auf, die bereits im vorhergehenden Versuch beobachtet worden waren. Die Mäuse bekamen nach 4-6 Tagen einen weichen (Serotyp O:3) bzw. wässrigen (Serotyp O:9) Stuhl, zeigten parallel dazu einen prallen, druckempfindlichen Bauch und hatten Schwierigkeiten, Faecesmaterial abzugeben. Diese Merkmale traten bei keinem der plasmidfreien Stämme auf. Nach 8 Tagen (2 Tage nach dem Wasserwechsel) waren diese Stämme nicht mehr im Kot der Tiere nachweisbar, während die Plasmidträger auch nach 18 Tagen noch ausgeschieden wurden (s. Abb. 24).
Aus Tabelle 13 geht auch die hohe Korrelation zwischen der Anwesenheit dieses Plasmides und dem Auftreten bestimmter Sypmtome, einschließlich der Fähigkeit, im tierischen Organismus zu kolonisieren, hervor.
Wegen der vermuteten Beteiligung an der Ausbildung der Virulenzantigene V und W wurde für das 63 Kb große Plasmid der Serotypen O:8 die Bezeichnung Vwa-Plasmid vorgeschlagen (Gemski et al., 1980). Auf Grund der großen Ähnlichkeit zu diesem Plasmid wurden die in dieser Arbeit untersuchten 66 bzw. 69 Kb großen Plasmide von Y. enterocolitica im folgenden ebenfalls als Vwa-Plasmide bezeichnet.

3.8. Sezernierung von Proteinen ins Kulturmedium

Heesemann et al. (1984) hatten festgestellt, daß plasmidtragende Zellen von Y. enterocolitica unter Calciummangelbedingungen eine beträchtliche Anzahl von Proteinen ins Kulturmedium ausschieden. Die Autoren konnten unter diesen Bedingungen bei den von ihnen untersuchten Stämmen etwa 10 Proteine aus dem Kul-

turüberstand isolieren, die bei Anzucht in Vollmedium mit Calcium nicht nachweisbar waren. Plasmidlose Zellen schieden dagegen unter keinen Bedingungen Substanzen aus, die sich mit Coomassieblau anfärben ließen.
Untersucht wurden die Überstände der Stämme 1803V$^+$ und 103V$^+$ sowie deren plasmidfreie Mutanten 1803V$^-$ und 103V$^-$. Die Bakterien wurden in BHI und BHI-MGOX (BHI mit einem Zusatz von 20 mM $MgCl_2$ und 20 mM Natriumoxalat) bei 37°C angezogen. Die Isolierung und Auftrennung der Proteine erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Wie die Zeichnung des PA-Gels in Abb. 25 zeigt, konnten keine Unterschiede im Proteinmuster des Kulturüberstandes für plasmidhaltige und plasmidfreie Stämme festgestellt werden. Die Konzentration der Ca^{2+}-Ionen schien für die Bildung dieser Proteine ohne Bedeutung zu sein.

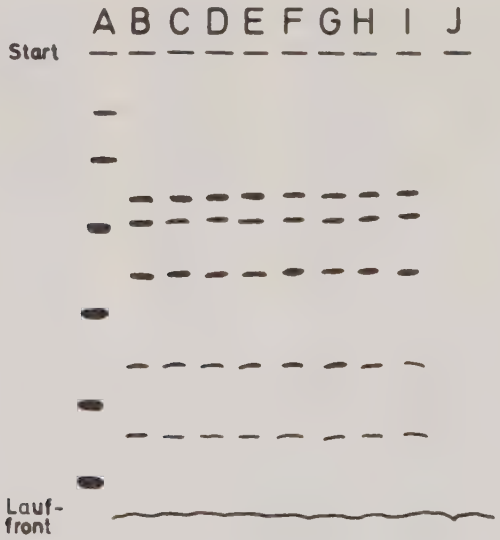


Abb. 25: SDS-PAGE-Profil der aus Kulturüberständen isolierten Proteine
A: Referenzproteine: Phosphorylase b (MG 94 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Hühnereialbumin (MG 43 000), Carboanhydrase (MG 30 000), Trypsininhibitor, (MG 20 100), α-Lactalbumin (MG 14 400); B: 1803V$^+$, BHI; C: 1803V$^+$, BHI-MGOX; D: 1803V$^-$, BHI; E: 1803V$^-$, BHI-MGOX; F: 103V$^+$, BHI; G: 103V$^+$, BHI-MGOX; H: 103V$^-$, BHI; I: 103V$^-$, BHI-MGOX; J: BHI als Kontrolle.

Die nun folgenden Versuche sollten helfen zu klären, ob die bisher in Verbindung mit diesem Plasmid aufgetretenen Eigenschaften tatsächlich von diesem kodiert werden und auch auf andere Mikroorganismen übertragen werden können.

Da das Vwa-Plasmid von Y. enterocolitica bislang keine bekannten, selektivierbaren Charakteristika aufweist, sollte zunächst versucht werden, eine geeignete Selektionsmethode für plasmidtragende Stämme zu entwickeln, ohne Manipulationen an dem Plasmid selbst vornehmen zu müssen.

4. Versuche zur Anreicherung plasmidtragender Stämme mit Hilfe von Antibiotika

Anhaltspunkte zur Erprobung einer solchen Methode bot die Calciumauxotrophie, die bei plasmidführenden Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C auftrat (s. Versuch 3.4.). Antibiotika, die nur auf wachsende Zellen wirken, sollten unter Calciummangelbedingungen und bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C nur die noch vermehrungsfähigen plasmidfreien Mutanten abtöten. Plasmidtragende Zellen, die ihre Zellteilungen unter diesen Bedingungen nach 2-3 Generationszyklen einstellten, könnten überleben, wenn das Antibiotikum anschließend zugefügt würde.

4.1. Bestimmung der MHK von verschiedenen Antibiotika

Von verschiedenen, geeignet erscheinenden Antibiotika wurde die MHK ermittelt (vgl. Methodenteil). Getestet wurde die Wirkung von Ampicillin, Bacitracin, Cephotaxim und Cycloserin gegenüber den Stämmen 1803V$^+$, der später als Donor eingesetzt werden sollte, 1803V$^-$ und B85A, der als Rezipient vorgesehen war. Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, lagen die Resistenzen der Yersinia-Stämme gegenüber diesen Antibiotika, mit Ausnahme von Cephotaxim, sehr hoch.

Tabelle 14: MHK verschiedener Antibiotika für Yersinia-Stämme

Stamm	MHK			
	Ampicillin	Cephotaxim	Bacitracin	Cycloserin
1803V$^+$	500µg/ml	<0,31µg/ml	125µg/ml	250µg/ml
1803V$^-$	500µg/ml	<0,31µg/ml	125µg/ml	250µg/ml
B85A	250µg/ml	<0,31µg/ml	125µg/ml	250µg/ml

Vorversuche sollten zeigen, ob mit Hilfe der ausgewählten Antibiotika eine Anreicherung von plasmidführenden Zellen unter Calciummangelbedingungen bei 37°C

durchgeführt werden konnte.

Dazu wurden je 10 ml BHI, angereichert mit 20 mM $MgCl_2$ und 20 mM Natriumoxalat, 1%ig aus einer frischen Übernachtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden zunächst 3 Stunden lang bei 37°C bebrütet, anschließend erfolgte der Temperaturwechsel, die Zellen wurden 3 Stunden lang bei 37°C gehalten, bevor die entsprechenden Antibiotika zugefügt wurden. Zugegeben wurden: 10µg/ml Cephotaxim, 2000µg/ml Ampicillin, 1000µg/ml Bacitracin und 1000µg/ml Cycloserin. Die Zellen wurden eine Stunde ohne Schütteln bei 37°C weiterinkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Nach dem Animpfen, vor dem Temperaturwechsel, vor der Zugabe der Antibiotika und nach 1stündigem Einwirken der Hemmstoffe wurden Proben entnommen und ausplattiert.

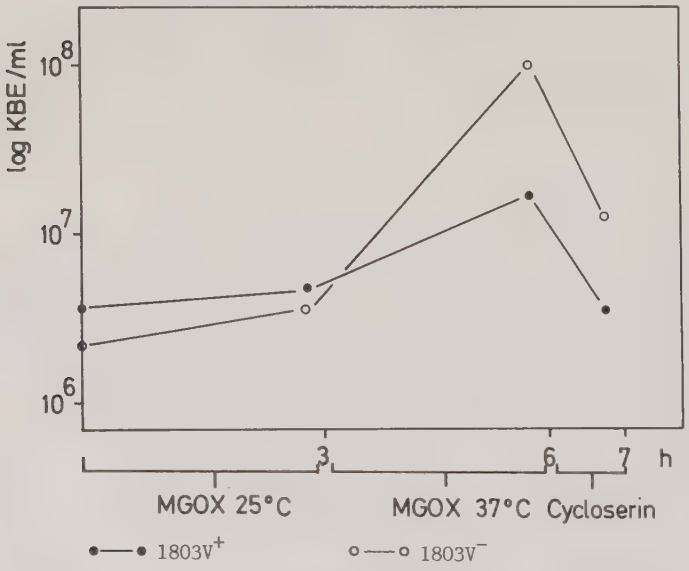


Abb. 26: Einwirkung von Cycloserin auf die Stämme $1803V^+$ und $1803V^-$ unter Calciummangelbedingungen bei 37°C.

Wie aus Abb. 26 zu ersehen ist, konnte mit dieser Methode kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Die Versuche mit Ampicillin und Bacitracin verliefen ähnlich wie im Falle von Cycloserin. Möglicherweise war die Resistenz der Bak-

terien zu hoch, um bei Zellzahlen, wie sie für eine Konjugation benötigt werden, eine ausreichende Reduktion zu erhalten.
Cephotaxim tötete zwar die plasmidfreien Zellen ab, jedoch überlebten auch die Plasmidträger nicht. Der unter Calciummangel eintretende Wachstumsstillstand schützt die Zellen u.U. nicht ausreichend, oder das verstärke Auftreten von Mutanten verhinderte die Isolierung von plasmidhaltigen Bakterien.

Da das Auxotrophenanreicherungsverfahren wenig erfolgversprechend verlaufen war, wurde nun versucht, auf dem Vwa-Plasmid selbst einen selektionsfähigen Marker zu etablieren.
Als Marker haben sich Antibiotikaresistenzen, Resistenzen gegen andere toxische Substanzen wie Schwermetalle oder Bacteriocine sowie die Fähigkeit, bestimmte Kohlenhydrate als Energiequelle zu nutzen, bewährt. Häufig angewendete Verfahren sind die Einklonierung von Markergenen mit Hilfe von Restriktionsenzymen sowie der Einsatz von Transposons.
Eine wichtige Voraussetzung für die aussichtsreiche Einfügung eines Genabschnittes in ein Plasmid beispielsweise, ist die Anwesenheit von möglichst nur einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Bisher ist eine solche Restriktionsendonuklease für das Vwa-Plasmid nicht bekannt. Bei der Verwendung von Restriktionsenzymen, die mehrere Schnittstellen auf einem Plasmid erkennen, ist die gezielte Einbringung eines Genabschnittes nicht mehr möglich. Oft können die entstandenen Fragmente auch nicht wieder in ihrer ursprünglichen Ordnung zusammengesetzt werden.
Aus diesen Gründen kam die Klonierung eines Markergens für das Vwa-Plasmid nicht in Betracht. Die Arbeit mit Transposons bot dagegen den Vorteil, daß Manipulationen in vivo vorgenommen werden konnten.

5. Versuche, das Vwa-Plasmid mit Hilfe verschiedener Transposons zu markieren

5.1. Tn 951

Das Transposon Tn 951 wurde zuerst auf dem Plasmid pGC1 gefunden (Cornelis et al., 1978) und beherbergt ein Lactose-Operon. PGC1 selbst ist ein konjugatives Plasmid, welches ursprünglich aus Y. enterocolitica isoliert worden ist (Cornelis et al., 1976). Da sowohl das Plasmid als auch das Transposon nach den von Cornelis durchgeführten Versuchen gute Übertragungseigenschaften zeigten (Cornelis et al., 1976; Cornelis et al., 1978), eröffnete sich die Möglichkeit, die lac-Gene auf das Vwa-Plasmid zu übertragen. Als vermittelndes Element sollte pGC1 dienen. Donor für pGC1/Tn 951 war Y. enterocolitica-Stamm Y 22701.

Der Stamm trug außer pGC1 kein weiteres Plasmid. Als Rezipient fand der Stamm 1803V$^+$N, eine Nalidixinsäure-resistente Mutante von 1803V$^+$, Verwendung.
Die Konjugation wurde wie in Material und Methoden aufgezeigt durchgeführt. Die Selektionierung wurde auf Minimalsalz-Medium, dem Nalidixinsäure in einer Konzentration von 10 µg/ml und 1 % Lactose (Endkonzentration) zugegeben worden waren, vorgenommen.
Es konnten zwar Konjuganten isoliert werden, die Fähigkeit, Lactose zu verwerten, war jedoch nicht stabil. Das gleiche Phänomen konnte nach mehrmaligem Überimpfen auch beim Donorstamm selbst beobachtet werden. Weitere Versuche mit diesem Transposon wurden daraufhin abgebrochen.

5.2. Tn 10 und Tn 5

Transposon 10 enthält Gene, die eine Resistenz gegen Tetracyclin vermitteln. Träger von Tn 10 war in diesem Versuch F'lac$_{ts}$, ein konjugatives Plasmid mit einem lac-Operon. Vorteilhaft an diesem Plasmid war, daß es sich um eine temperatursensitive Mutante handelte, die bei einer Inkubationstemperatur von 42°C nicht mehr repliziert werden konnte. Als Donor fungierte E. coli-Stamm C$_{600}$, ein Stamm, der auxotroph für die Aminosäuren Treonin und Lysin und für Vitamin B$_1$ ist. Außerdem war der Stamm recA-negativ. Als Rezipienten wurden 1803V$^+$S, 2703V$^+$S, MCH 628$^+$S und 2609$^+$S, Streptomycin-resistente Mutanten der Stämme 1803V$^+$, 2703V$^+$, MCH 628$^+$ und 2609V$^+$, verwendet. Die Konjugation wurde wie beschrieben ausgeführt. Die Selektionierung erfolgte auf Mac Conkey-Agar, dem Streptomycin (100 µg/ml) und Tetracyclin (20µg/ml) beigegeben worden waren.
Nur bei der Konjugation zwischen C$_{600}$F'lac$_{ts}$::Tn10 und MCH 628 wuchsen Kolonien auf den Selektivplatten. Diese Kolonien wurden isoliert und erneut auf das Selektivmedium sowie auf Vollmedium überimpft. Es zeigte sich, daß die Isolate die Resistenz gegen Tetracyclin, die ja das Transposon vermitteln sollte, verloren hatten. Die Klone besaßen auch keine extrachromosomale DNA mehr, wie Abb. 27 zeigt, obwohl die Zellen Lactose verwerten konnten.
Die Anzucht der Zellen bei 43°C führte nicht zum Verlust der Fähigkeit, Lactose vergären zu können, ein Hinweis darauf, daß das F'lac-Plasmid ins Chromosom integriert worden sein könnte.
Mehrere Wiederholungen, bei denen statt Tn 10 auch das Kanamycin-Transposon Tn 5 eingesetzt wurde, bestätigten die für F'lac gefundenen Ergebnisse.
Über den Verbleib des Vwa-Plasmides sowie der Transposons konnte keine Aussage getroffen werden. Die Ergebnisse ließen jedoch vermuten, daß die beiden Plasmide nicht kompatibel sind und F'lac$_{ts}$ die Replikation des Vwa-Plasmides unter-

drückt hatte.

Das F'lac_{ts}-Plasmid war nach den vorliegenden Befunden, zumindest für Y. enterocolitica-Stämme, die das Vwa-Plasmid beherbergten, nicht als Überträger von Transposons geeignet.

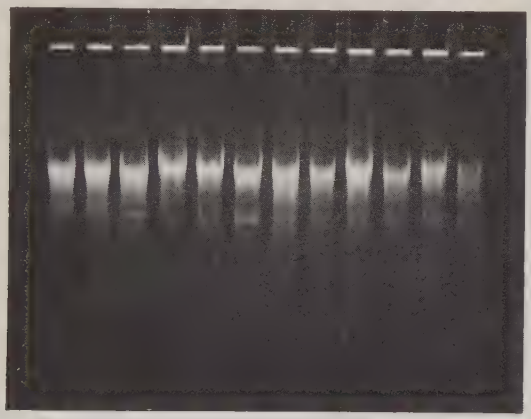


Abb. 27: Verlust der Plasmid-DNA bei Klonen, die nach der Konjugation zwischen $C_{600}F'lac_{ts}$::Tn 10 und Y. enterocolitica MCH 628 isoliert worden waren.

5.3. $RP1_{ts}$ als Vehikel für Y. enterocolitica

Die Suche nach einem geeigneteren Überträger-Plasmid führte zu $RP1_{ts}$, einer temperaturempfindlichen Mutante des Resistenzplasmides RP1 (Grinsted et al., 1972), die oberhalb einer Temperatur von 30°C nicht mehr repliziert wird. Das konjugative Plasmid gehört zur Inkompatibilitätsgruppe P und besitzt ein weites Wirtsspektrum (Jacob und Grinter, 1975).

Als genetische Marker sind auf RP1 Resistenzen gegen Kanamycin, Tetracyclin und Ampicillin lokalisiert. Die Ampicillin-Resistenz wird dabei von Tn 1 vermittelt.

Die von Natur aus recht hohe Eigenresistenz von Y. enterocolitica gegenüber Ampicillin und ähnlichen Antibiotika ließ zunächst die Verwendung von Tn 1 zur Markierung des Vwa-Plasmides nicht sinnvoll erscheinen. Tn 5, Tn 10 und Tn 3 (Ampicillin) konnten in Verbindung mit RP1 wegen der auf RP1 lokalisierten Resistenzen und dën sich daraus ergebenden Schwierigkeiten bei der Selektionierung ebenfalls nicht eingesetzt werden. Von zwei anderen Transposons, Tn 7 und Tn 501, war bekannt, daß sie sehr leicht auf das Plasmid RP1 transponieren

(Grinsted et al., 1978; Barth und Grinter, 1977). Tn 7 trägt Gene, die Resistenzen gegen Trimethoprim und Streptomycin vermitteln, die Gene von Tn 501 verleihen eine Resistenz gegen Quecksilber.

5.4. Transposition von Tn 7 auf $RP1_{ts}$

Folgende Stämme wurden verwendet: E. coli K12 UB 281, E. coli K12 UB 5236, E. coli K12 C_{600}. Die wichtigsten Eigenschaften der Stämme sind noch einmal in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 15: Charakteristika der am folgenden Versuch beteiligten Stämme

Stamm	Charakteristische Merkmale
E. coli K12 UB 281	Pro, Met, Nal^r, $RP1_{ts}$, Amp^r, Tet^r, Kan^r
E. coli K12 UB 5236	Trp, His, Lys, StrA, Tn 7, Tri^r, Str^r
E. coli K12 C_{600}	Thr, Lys, B_1, StrA, hsdM, hsdR

Stamm UB 5281 ist eine Nalidixinsäure-resistente Mutante des E. coli-Stammes J 53. Der Stamm ist auxotroph für Prolin und Methionin und beherbergt eine temperaturempfindliche Mutante des Resistenzplasmides RP1 (Kopecko, pers. Mitteilung). Stamm UB 5236 ist ebenfalls ein E . coli K12-Stamm, mit einer im Chromosom lokalisierten Resistenz gegen Streptomycin. Der Stamm trägt außerdem das Transposon Tn 7 (12,75 Kb) in seinem Chromosom, wodurch die Resistenzen gegen Trimethoprim und zusätzlich noch einmal Streptomycin bedingt sind. UB 5236 ist auxotroph für die Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Lysin.
Die Transposition von Tn 7 auf das Plasmid $RP1_{ts}$ erforderte mehrere Schritte, die in Abb. 28 schematisch aufgezeigt wurden.

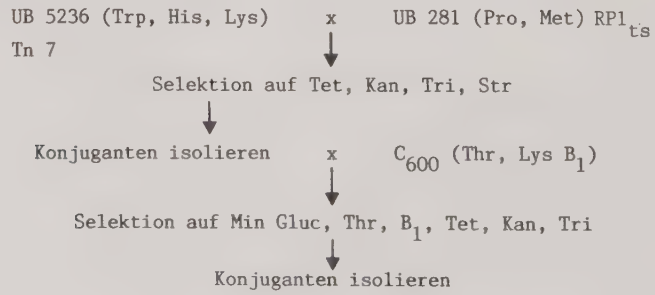


Abb. 28: Schema zur Etablierung von Tn 7 auf $RP1_{ts}$

Zunächst wurde versucht, das Plasmid $RP1_{ts}$ in den Stamm, der das Transposon im Chromosom hielt, einzukonjugieren. Als Donor für $RP1_{ts}$ diente UB 281, Rezipient war UB 5236. Die Konjugation erfolgte abweichend von dem in Material und Methoden beschriebenen Verfahren in einer Flüssigkultur. 1 ml einer Übernachtkultur des Donorstammes wurde mit 3 ml einer Übernachtkultur des Rezipientenstammes gemischt und mit 6 ml frischem Medium (LB) aufgefüllt. Nach 6stündiger Bebrütung bei 25°C wurden jeweils 100 µl dieser Suspension auf je 10 Platten mit Selektivmedium ausplattiert und bebrütet (25°C,ü.N.). Als Selektivmedium wurde Isosensitest-Agar verwendet, dem jeweils 25 µg/ml Tetracyclin, Kanamycin und Trimethoprim sowie 100 µg/ml Streptomycin zugefügt worden waren. Die Konjugationsfrequenz betrug im Durchschnitt 6×10^{-6}. Die erhaltenen Konjuganten wurden isoliert und erneut auf die erworbenen Resistenzen hin untersucht. Diese Überprüfung wurde auf Minimalsalz-Medium durchgeführt, dem Glucose (1 %), Tryptophan (0,001 %), Histidin (0,001 %), Lysin (0,001 %) sowie je 25 µg/ml der Antibiotika Tetracyclin, Kanamycin und Trimethoprim beigemischt worden waren. Nur die isolierten Konjuganten bildeten auf diesem Medium Kolonien aus, Donor und Rezipient wuchsen erwartungsgemäß nicht. Das zeigte, daß das Plasmid $RP1_{ts}$ in den Rezipienten hineingegangen war.

Als nächstes sollten die RP1-Plasmide isoliert werden, auf die Tn 7 transponiert war. Dies konnte erreicht werden, indem das Plasmid aus dem Rezipientenstamm UB 5236 in einen zweiten Rezipienten überführt wurde, wobei ein Selektionsdruck durch Trimethoprim ausgeübt wurde. Als Rezipient fungierte diesmal C_{600}, Donor war UB 5236. Die Selektionierung erfolgte wiederum auf Minimalsalz-Medium, mit einem Zusatz von Glucose (1 %), Threonin (0,001 %), Lysin (0,001 %), Vitamin B_1 (0,001 %), Tetracyclin (25 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml) und Trimethoprim (25 µg/ml). Konjuganten traten mit einer Frequenz von 10^{-6} auf. Die Konjuganten hatten neben den für RP1 charakteristischen Resistenzen auch die Resistenz gegen Trimethoprim erhalten, d.h. diese Resistenz ist ebenfalls bei der Konjugation übertragen worden. Das weist auf eine erfolgreiche Transposition von Tn 7 hin. Die aus den Konjuganten isolierte DNA zeigte auch erwartungsgemäß eine leichte Zunahme der Größe gegenüber $RP1_{ts}$ (vgl. Abb. 29.)

Die Konjuganten erhielten die Bezeichnung $C_{600}RP1_{ts}Tn7$.

5.5. Transposition von Tn 501 auf $RP1_{ts}$

Die Transposition von Tn 501, einem Transposon mit einer Größe von 7,8 Kb, welches Gene für die Resistenz gegen Quecksilber trägt, erfolgte analog der von Tn 7. Als Donor wurde wiederum E. coli UB 281 (s. Tabelle 15) eingesetzt,

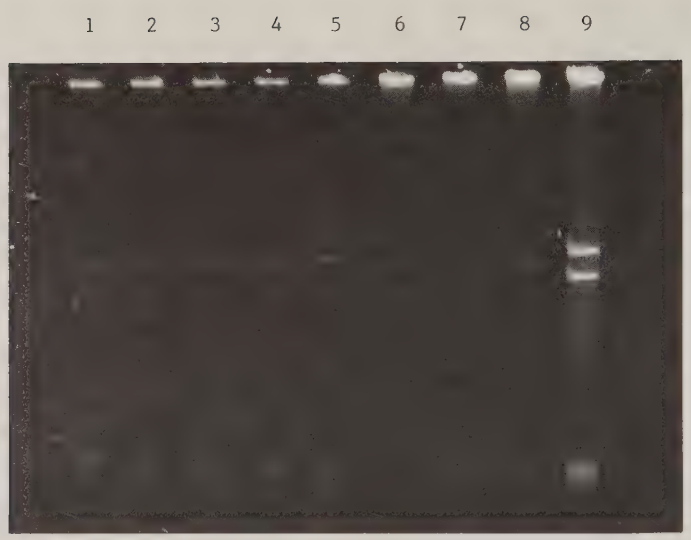


Abb. 29: Auftrennung der Plasmid-DNA aus den Konjuganten $C_{600}RP1_{ts}Tn7$
Spalten 1 bis 8: DNA der Konjuganten aus der Konjugation zwischen Stamm UB 5236 $RP1_{ts}Tn7$ und Stamm C_{600}, Plasmid $RP1_{ts}$::Tn 7; Spalte 9: DNA der Plasmide $RP1_{ts}$ (57 Kb) und Vwa (69 Kb).

der Rezipient, E. coli K12 UB 5203, war auxotroph für die Aminosäuren Prolin und Methionin und Nalidixinsäure-resistent. Das Transposon Tn 501 war wieder im Chromosom des Stammes lokalisiert.
Die Konjugation wurde ebenfalls in Flüssigkultur durchgeführt (s. 5.4.), das Selektionsmedium, Minimalsalz-Medium, war angereichert mit Glucose (1 %), Prolin (0,001 %), Methionin (0,001 %), Quecksilberchlorid (10 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml). Die isolierten Konjuganten dienten nach ihrer Überprüfung in einem erneuten Konjugationsansatz als Donoren, um zu testen, ob das Transposon zusammen mit dem Plasmid $RP1_{ts}$ übertragen wurde. Als Rezipient wurde wie im vorherigen Versuch E. coli C_{600} eingesetzt.
Die gewonnenen Konjuganten hatten außer den für RP1 bezeichnenden Resistenzen auch die Quecksilberresistenz von Tn 501 erworben, d.h. Tn 501 war mit dem Plasmid $RP1_{ts}$ übertragen worden.
Die Konjuganten wurden $C_{600}RP1_{ts}Tn501$ benannt.

5.6. Transfer von $RP1_{ts}$::Tn 501 auf Y. enterocolitica

Der neu konstruierte Stamm $C_{600}RP1_{ts}Tn501$ diente als Ausgangsmaterial für diesen Versuch. Es sollte überprüft werden, ob das Plasmid $RP1_{ts}$ in Y. enterocolitica repliziert und exprimiert werden konnte, und ob Tn 501 als Marker für das Vwa-Plasmid in Frage käme.

Zunächst galt es, ein geeignetes Selektivmedium für eventuelle Konjuganten zu finden. Dabei konnte die Auxotrophie des Donorstammes C_{600} ausgenutzt werden. Da Y. enterocolitica auf nur mit Glucose angereichertem Minimalsalz-Medium nur sehr schlecht wuchs, wurde eine Aminosäuremischung zusammengestellt, die Yersinia einerseits ein ausreichendes Wachstum erlaubte, andererseits dem auf Threonin, Lysin und Vitamin B_1 angewiesenen Donorstamm keine Entwicklungsmöglichkeiten bot. Die Konjugation, bei der Stamm $1803V^+$ als Rezipient herangezogen wurde, erfolgte wie im Methodenteil aufgeführt. Der als Selektionsmedium verwendete Minimalsalz-Agar enthielt neben Glucose (1 %), Quecksilberchlorid (20 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) sowie je 0.001 % der Aminosäuren Tyrosin, Glycin, Arginin, Valin, Phenylalanin, Alanin und Glutaminsäure.

Weder der Rezipient noch der Donor konnten auf diesem Medium wachsen. Die Konjugationsfrequenz lag bei 10^{-8}, war also relativ niedrig. Trotzdem konnte eine Reihe von Konjuganten isoliert werden, die neben dem Vwa-Plasmid auch noch RP1 besaßen (s. Abb. 30).

Die Isolate zeigten neben den für RP1 charakteristischen Resistenzen gegen Ampicillin, Tetracyclin und Kanamycin auch die von Tn 501 vermittelte Quecksilberresistenz.

Im nächsten Schritt wurde nun versucht, das Trägerplasmid $RP1_{ts}$ in Anwesenheit von Quecksilberchlorid zu eliminieren, um so eine Transposition von Tn 501 auf das Vwa-Plasmid zu erzwingen. Da $RP1_{ts}$ oberhalb einer Temperatur von 30°C nicht mehr repliziert werden konnte, wurden die Konjuganten über mehrere Zellzyklen hinweg bei 37°C in 50 ml Vollmedium, angereichert mit 20 µg/ml Quecksilberchlorid, gehalten. Die Zellen wurden dabei 2-3mal in frisches Quecksilbermedium überimpft. Anschließend wurden durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsreihe auf Quecksilber-haltigem Medium Einzelkolonien gewonnen, die auf den Verlust von $RP1_{ts}$ überprüft wurden. Dazu wurden 200-300 Kolonien in je 100 µl frische Nährlösung (LB) in Mikrotiterplatten überimpft und 4-6 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden diese Kulturen mit Hilfe eines Metallstempels (s. Abb. 2) auf je 2 Selektivplatten sowie auf TSA-Platten übertragen. Ein Selektivmedium enthielt 20 µg/ml Quecksilberchlorid, dem anderen waren Tetracyclin (25 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) zugefügt worden. Basismedium war

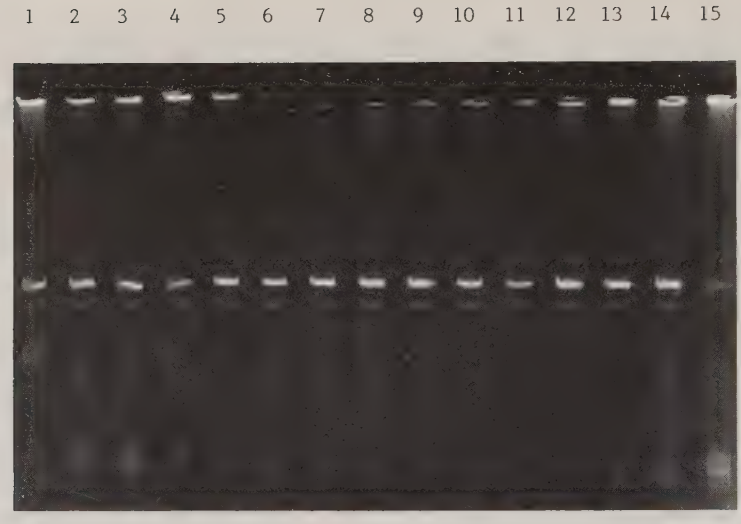


Abb. 30: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA von Konjuganten aus der Konjugation zwischen $C_{600}RP1_{ts}Tn501$ und $1803V^{+}$
Spalten 1 bis 14: Konjuganten; Spalte 15: Plasmide Vwa (69 Kb) und $RP1_{ts}$ (58 Kb)

in beiden Fällen Iso-Sensitest-Agar.
Nachdem sich auf dem Vollmedium Kolonien entwickelt hatten (ü.N., 25°C), wurden die Platten ausgewertet. Es wurden nur solche Kolonien isoliert, die resistent gegen Quecksilber waren, auf den Antibiotika-haltigen Platten aber kein Wachstum zeigten.
Etwa 40 % der Zellen hatten nach dieser Behandlung das Plasmid $RP1_{ts}$ verloren. Der Verlust von $RP1_{ts}$ wurde durch die Untersuchung der Plasmid-DNA bestätigt. Wie Abb. 31 zeigt , hatten die meisten Isolate nur noch ein Plasmid in der Größe des Vwa-Plasmides. Diese Stämme wurden $1803V^{+}Tn501$ genannt.
Die Abb. 31 läßt allerdings keine Vergrößerung des Vwa-Plasmides erkennen, wie sie bei einer erfolgten Transposition von Tn 501 erwartet worden wäre.
Ob Tn 501 tatsächlich auf das Yersinia-Plasmid übergegangen war, sollte mit Hilfe von Verlustmutanten geklärt werden. Falls das Transposon in das Vwa-Plasmid inseriert hatte, würde mit dem Verlust dieses Plasmides auch die Quecksilberresistenz verschwinden. Auf Calciummangelmedium (MGOX-Agar) wurden Vwa-negative

Mutanten von Stamm 1803V^{+}Tn501 isoliert. Eine Untersuchung dieser Mutanten ergab, daß die Quecksilberresistenz auch in völlig plasmidfreien Zellen auftrat. Es mußte daher angenommen werden, daß Tn 501 ins Chromosom von Y. enterocolitica inseriert war. Damit erwies sich Tn 501 als nicht geeignet zur Markierung des Vwa-Plasmides.

Abb. 31: Auftrennung der Plasmid-DNA von Klonen des Stammes 1803V^{+}RP1$_{ts}$Tn501 nach Eliminierung von RP1$_{ts}$
Spalten 1 bis 6: Plasmid-DNA der Klone; Spalte 7: Referenz-DNA, Vwa (69 Kb), RP1$_{ts}$(58 Kb)

5.7. Transfer von RP1$_{ts}$::Tn7 auf Y. enterocolitica

Da RP1 als Überträgerplasmid für Y. enterocolitica wesentlich besser geeignet war als F'lac, wurde der Versuch, das Vwa-Plasmid zu markieren, mit Tn 7 wiederholt.
Als Donor fand diesmal der in Versuch 5.4. konstruierte Stamm C$_{600}$RP1$_{ts}$Tn7 Ver-

wendung. Rezipienten waren Nalidixinsäure-resistente (N) oder Streptomycin-resistente (S) Spontanmutanten der Stämme $1803V^+$, $103V^+$ und $2609V^+$. Nach Abschluß der Konjugation erfolgte die Selektion wiederum auf Minimalsalz-Medium, dem neben Glucose (1 %) und einem Gemisch der Animosäuren Glycin, Arginin, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Alanin und Glutaminsäure (jeweils 0,001 % Endkonzentration) die Antibiotika Tetracyclin (25 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml) und Trimethoprim (25 µg/ml) zugefügt worden waren.

Konjuganten traten mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-7} bei der Konjugation mit den Stämmen $1803V^+N$ und $103V^+N$ auf. Mit Stamm $2609V^+S$ als Rezipient konnten keine Konjuganten gewonnen werden. Die erhaltenen Klone wurden erneut auf die erworbenen Resistenzen hin überprüft. Zusätzlich wurden die Isolate auf ihre Agglutinierbarkeit mit Y. enterocolitica-Antiserum O:3 getestet, um auszuschließen, daß Donorzellen isoliert worden waren. Die folgende Plasmidextraktion ergab ein recht heterogenes Bild (vgl. Abb 32).

Nur 2 von Stamm $103V^+N$ erhaltene Klone besaßen neben dem Vwa-Plasmid auch $RP1_{ts}$ (s. Abb. 32, Spalten 11 und 15), die übrigen zeigten nur Vwa. Einige Klone des Stammes $1803V^+N$ hatten ebenfalls nur das Vwa-Plasmid (Abb. 32, Spalten 3, 6 und 7), andere beherbergten 2 oder mehr Plasmide (Spalten 8 und 9) und wieder andere beinhalteten ein Plasmid, dessen Größe die des Vwa-Plasmides noch deutlich übertraf (Spalten 1, 2 und 4). Um Präparationsartefakte wie Dimere auszuschließen, wurden die Präparationen mit Phenol behandelt und weiter konzentriert. Abb. 33 zeigt die Auftrennung der DNA-Proben nach der Phenolbehandlung.

Die Mehrzahl der Konjuganten wies nun 2 Plasmide auf: $RP1_{ts}$::Tn 7, erkennbar an der deutlichen Vergrößerung gegenüber dem ursprünglichen Plasmid (vgl. Spalte 1), und ein Plasmid in der Größe des Vwa-Plasmides. Bei einigen Konjuganten schien dieses Plasmid sogar noch etwas größer als das Vwa-Plasmid zu sein (s. Spalten 6, 7 und 9).

Wie bereits im vorigen Versuch sollte nun das Trägerplasmid $RP1_{ts}$ entfernt werden und gleichzeitig unter dem Selektionsdruck von Trimethoprim die Transposition von Tn 7 auf das Vwa-Plasmid erzwungen werden. Die Eliminierung von $RP1_{ts}$ erfolgte wie bereits zuvor durch eine ausgedehnte Inkubation bei 37°C über einige Zellzyklen hinweg (vgl. 5.6.). Ziel der nachfolgenden Selektion war es, Klone zu gewinnen, die zwar noch resistent gegen Trimethoprim waren, ihre Unempfindlichkeit gegenüber Kanamycin und Tetracyclin aber verloren hatten.

Eine Analyse der extrachromosomalen DNA bestätigte die erfolgreiche Beseitigung von $RP1_{ts}$ (s. Abb. 34). Außerdem ist auf der Abb. 34 in einigen Klonen die Vergrößerung des Vwa-Plasmides zu erkennen. Besonders deutlich sichtbar ist dies

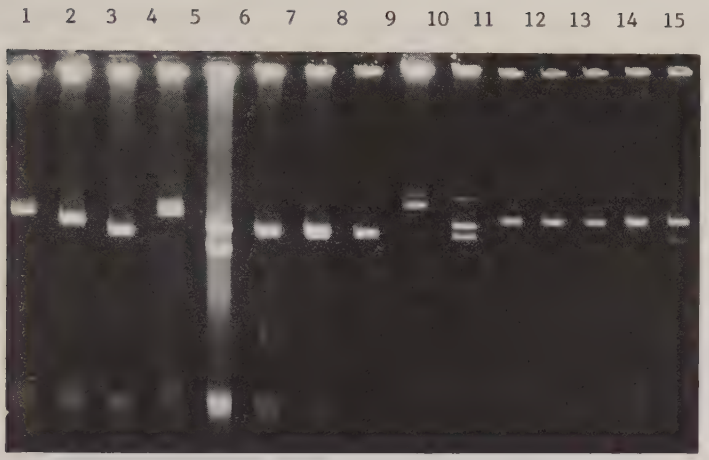


Abb. 32: Analyse der aus Konjuganten extrahierten Plasmid-DNA
Spalten 1 bis 4 und 6 bis 10: DNA aus Konjuganten mit 1803V^{+}N als Rezipient; Spalten 11 bis 15: DNA aus Konjuganten mit 103V^{+}N als Rezipient; Spalte 5: Referenz-DNA (Vwa und RP1$_{ts}$).

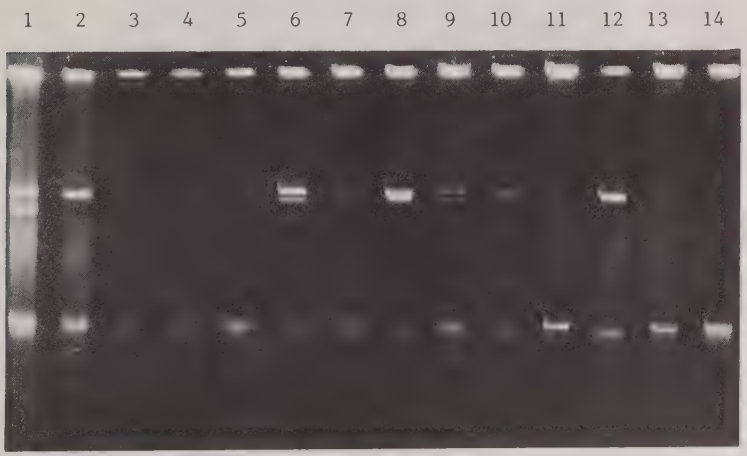


Abb. 33: Auftrennung der DNA von Konjuganten mit 1803V^{+}N als Rezipienten nach der Behandlung mit Phenol
Spalten 1 und 2: Referenz-DNA (RP1$_{ts}$ und Vwa); Spalten 3 bis 14: Konjuganten-DNA

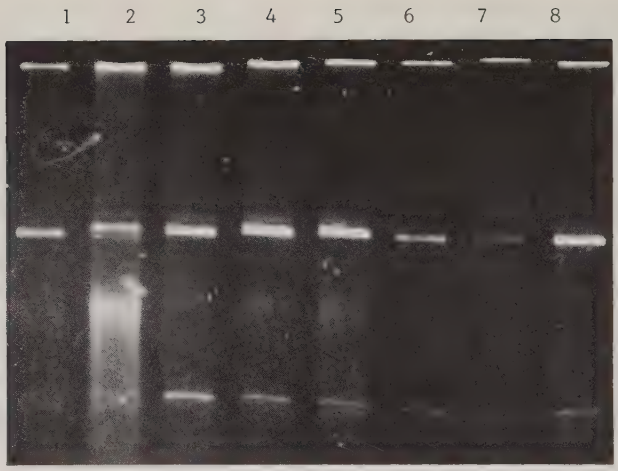


Abb. 34: Analyse der Plasmid-DNA von Konjuganten aus der Konjugation zwischen $C_{600}RP1_{ts}Tn7$ und $1803V^{+}N$ sowie $103V^{+}N$ nach der Eliminierung von $RP1_{ts}$
Spalte 1: Referenz-DNA (Plasmid Vwa); Spalten 2 bis 6: Konjuganten von $1803V^{+}N$; Spalten 7 und 8: Konjuganten von $103V^{+}N$.

in der Spalte 2 von Abb. 34, wo oberhalb einer dünnen Bande in Höhe des Vwa-Plasmides eine zweite Bande die Anwesenheit eines weiteren, größeren Plasmides belegt.
Ob sich das Transposon Tn 7 tatsächlich als Marker auf dem Vwa-Plasmid etabliert hatte, sollte nun wiederum mit Hilfe plasmidfreier Mutanten geklärt werden. Überraschenderweise hatten alle Mutanten auch nach dem Verlust des Vwa-Plasmides ihre Trimethoprimresistenz behalten. Dies war vor allem für die Konjuganten erstaunlich, bei denen eine offensichtliche Vergrößerung des Vwa-Plasmides beobachtet worden war.
Nach diesen Befunden konnte die Resistenz gegen Trimethoprim nun nicht als verläßlicher Marker für das Vwa-Plasmid verwendet werden. Die Zunahme des Gewichtes von Vwa war also demnach nicht auf eine Transposition von Tn 7 zurückzuführen.

6. Transposition von Tn 1 auf das Vwa-Plasmid

Die zunächst unerklärbare Vergrößerung von Vwa während der Transpositionsversuche mit Tn 7 gab den Anlaß, weitere Untersuchungen anzustellen. Die Ursache für diesen

stabilen und gut reproduzierbaren Vorgang sollte näher betrachtet werden. Interessant schienen vornehmlich die Stämme, bei denen nach der Eliminierung von $RP1_{ts}$ noch eine Resistenz gegen Trimethoprim festgestellt worden war.
Diese als $1803V^{+}$Tn7 bezeichneten Stämme wurden zunächst erneut auf ihre Antibiotikaresistenzen hin überprüft, um sicher zu stellen, daß einerseits alle von RP1 vermittelten Resistenzen verschwunden waren und andererseits die Trimethoprimresistenz unverändert stabil geblieben war. Sämtliche Antibiotika wurden getrennt getestet. Dabei ließ sich folgendes festhalten: 1. Die untersuchten Stämme waren alle gegenüber Kanamycin und Tetracyclin empfindlich. 2. Für etwa die Hälfte der untersuchten Stämme konnte die Trimethoprimresistenz nicht mehr nachgewiesen werden. 3. Einige der Stämme waren erstaunlicherweise resistent gegenüber Ampicillin, während andere Stämme bei einer Inkubationstemperatur von 37°C von 100 µg/ml Ampicillin im Medium gehemmt wurden.
Ein gezielter Versuch, die Transposition von Tn 1 von $RP1_{ts}$ auf das Vwa-Plasmid zu erzwingen, wurde nach der für Tn 501 beschriebenen Methode (s. 5.5.) mit dem Stamm $1803V^{+}N$ $RP1_{ts}$ durchgeführt.

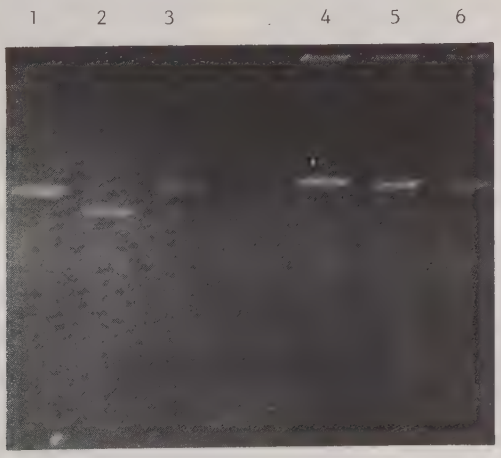


Abb. 35: Vergrößerung des Vwa-Plasmides bei Ampicillin-resistenten Konjuganten von $1803V^{+}N$ nach der Eliminierung von $RP1_{ts}$
Spalte 1: Plasmid Vwa (69 Kb); Spalte 2: Plasmid $RP1_{ts}$ (58 Kb); Spalten 3 und 4: Ampicillin-resistente Konjuganten; Spalten 5 und 6: Konjuganten, die empfindlich gegenüber Ampicillin bei 37°C reagierten

Von 200 Klonen, die die Resistenzen gegen Tetracyclin und Kanamycin und somit auch das Plasmid RPl_{ts} verloren hatten, waren 14 Isolate resistent gegenüber Ampicillin. Die gelelektrophoretische Analyse der Plasmid-DNA aus diesen Stämmen zeigte eine hohe Korrelation zwischen der beobachteten Vergrößerung des Vwa-Plasmides und dem Auftreten der Ampicillinresistenz (vgl. Abb. 35).
Die Ampicillin-resistenten Isoltate erhielten die Bezeichnung $718V^+$ mit einer fortlaufenden Nummerierung. Das neue Plasmid Vwa::Tn1 wurde pMB 718 genannt.

6.1. Vergleich der Schnittmuster von Vwa und dem Plasmid der $718V^+$-Stämme

Eine Restriktionsanalyse sollte Auskunft darüber geben, an welcher Stelle des Vwa-Plasmides die Insertion des Transposons stattgefunden hatte. Als Enzyme wurden Hind III und Eco RI verwendet.
Abb. 36 zeigt die Schnittmuster des Vwa-Plasmides, isoliert aus Stamm $1803V^+$ (Spalten 1 und 4), und des Plasmides des Konjuganten $718V^+$-22 (Spalten 2 und 3) für die Restriktionsendonukleasen Hind III und Eco RI.
Die Verdauung mit dem Enzym Hind III ließ bei dem vergrößerten Plasmid neben den für das Vwa-Plasmid charakteristischen Fragmenten noch eine weitere Bande erkennen. Die Größe des zusätzlichen Fragmentes betrug 8 Kb. Dies weist darauf hin, daß das etwa 6 Kb große Transposon (Grinsted et al., 1978) in eins der etwa 2 Kb großen Fragmente H9, H10 oder H11, die auf dieser Abbildung nicht mehr zu sehen sind, inseriert hatte (vgl. auch Abb. 14).
Im Schnittmuster des Enzyms Eco RI fehlte dem Konjuganten das 3. Eco RI-Fragment (E3) (vgl. auch Abb. 13), dafür erscheint die Bande des 1. Fragmentes viel dicker. Dies deutet an, daß das Transposon in das ca. 12 Kb große Fragment E3 gesprungen ist, wodurch ein neues Fragment mit einer Größe von etwa 18 Kb entstanden ist. Daher ist es wahrscheinlich, daß sich hinter der dickeren Bande für das erste Fragment E1 eine 17/18 Kb große Doppelbande verbirgt.

Durch die Insertion von Transposons können, wie auch bei anderen DNA-Stücken, Gene ausgeschaltet oder Mutationen hervorgerufen werden. Es mußte deshalb überprüft werden, ob wesentliche, durch das Vwa-Plasmid determinierte Eigenschaften durch die Transposition von Tn1 beeinträchtigt worden sind.

7. Eigenschaften von pMB 718

Untersucht wurden die Ausbildung des Koloniedimorphismusses bei 37°C, die Calciumbedürftigkeit bei 37°C, die Fähigkeit zur Autoagglutination bei 37°C sowie das Verhalten im Maus-Diarrhöe-Modell.

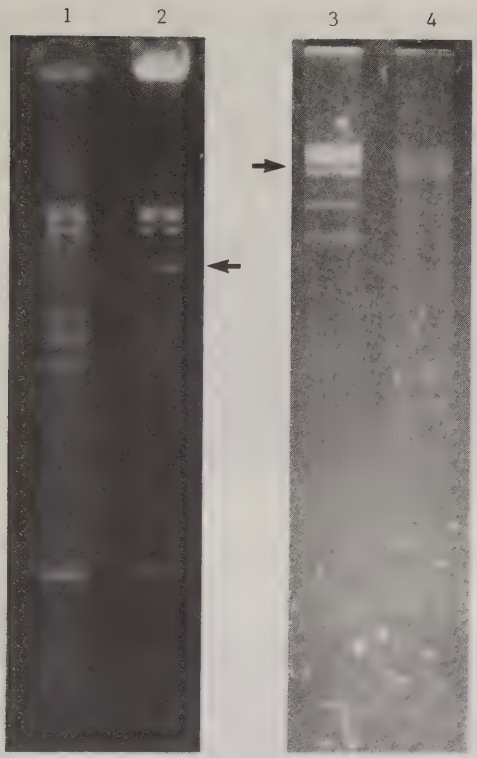


Abb. 36: Restriktionsanalyse für Stamm 1803V$^+$ und den Konjuganten 718V$^+$-22
Spalte 1: 1803V$^+$, verdaut mit Hind III; Spalte 2: 718V$^+$-22, verdaut mit Hind III;
Spalte 3: 718V$^+$-22, geschnitten mit Eco RI; Spalte 4: 1803V$^+$, geschnitten mit
Eco RI. Auf das zusätzliche Hind III-Fragment bzw. das fehlende Eco RI-Fragment
bei 718V$^+$-22 ist durch Pfeile hingewiesen.

7.1. Koloniedimorphismus bei 37°C

Abb. 37 zeigt das Wachstum von Stamm 718V$^+$ nach einer Inkubation bei 37°C auf TSA (18 h). Der Unterschied in der Koloniegröße war deutlich sichtbar. Typisch war auch das Auftreten segregierender Kolonien, d.h. kleiner plasmidtragender Kolonien, die dicht neben großen plasmidlosen Kolonien lagen (s. Pfeil).

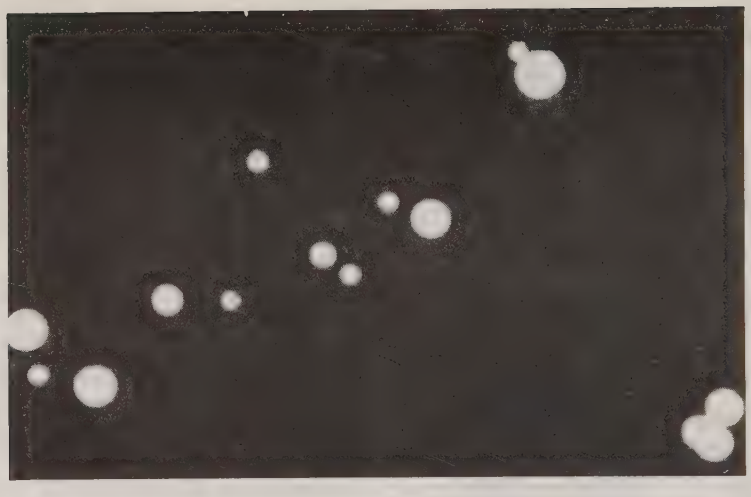


Abb. 37: Koloniedimorphismus bei dem Konjuganten $718V^{+}$

Abb. 38: Calciumbedürftigkeit von $718V^{+}$ bei 37°C
Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C entwickelten sich auf MGOX-Medium nur 2 Kolonien (Pfeile). Nach der Weiterbebrütung der Platte bei 25°C wuchsen auch die vorher gehemmten Kolonien normal aus.

7.2. Calciumbedürftigkeit bei 37°C

Wie aus der Abb. 38 zu ersehen ist, trat auf Calciummangelmedium (MGOX) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C eine deutliche Wachstumshemmung auf. Erst nach der Weiterbebrütung der Platten bei 25°C entwickelten sich die gehemmten Kolonien normal.

7.3. Fähigkeit zur Autoagglutination

Für diesen Versuch wurden jeweils kleine , calciumabhängige Kolonien in Röhrchen mit LB-Medium überimpft. Ein Teil der Kulturen wurde bei 37°C, der andere Teil wurde bei 25°C angezogen. Wie Abb. 39 veranschaulicht, autoagglutinierten die Zellen, wenn sie bei 37°C angezogen worden waren, während bei 25°C die Nährlösung eine homogene Trübung aufwies (vgl. auch Abb. 20).

Abb. 39: Fähigkeit zur Autoagglutination bei dem dem Transformanten 718V$^+$ bei 25° und 37°C
Röhrchen 1: 718V$^+$, 37°C; Röhrchen 2: 718V$^+$, 25°C

7.4. Resistenz von 718V$^+$ gegenüber Humanserum

In Abb. 40 ist das Verhalten von Stamm 1803V$^+$ sowie der plasmidfreien Mutante 718V$^-$ dargestellt. Stamm 1803V$^+$ diente in diesem Versuch als Kontrolle.
Während die plasmidfreie Mutante schnell durch das Komplementsystem inaktiviert wurde und abstarb, überlebte der plasmidtragende Stamm 718V$^+$ genauso wie der Kontrollstamm 1803V$^+$ (vgl. Abb. 21 und 22).
Dies zeigt, daß die Serumresistenz durch die Insertion des Transposons ebenfalls nicht beeinträchtigt worden ist.

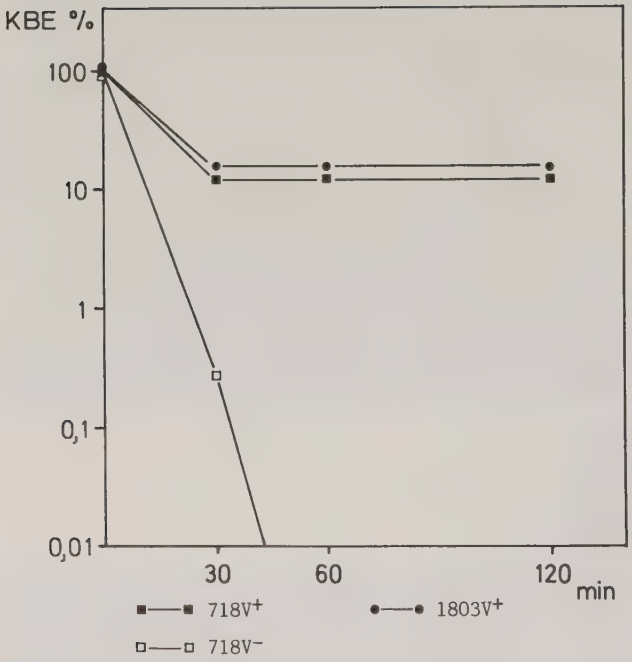


Abb. 40: Serumresistenz bei plasmidtragenden und plasmidfreien Zellen von 718V$^+$ bzw. 718V$^-$ im Vergleich zum Kontrollstamm 1803V$^+$

7.5. Kolonisationsverhalten von 718V$^+$ und 718V$^-$ im Maus-Diarrhöe-Modell

Der Versuch wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abb. 41 veranschaulicht das Ergebnis im Vergleich zu Stamm 1803V$^+$ und seiner plasmidnegativen Mutante 1803V$^-$.
Das mit Tn 1 markierte Plasmid ermöglichte dem Stamm 718 V$^+$ in gleicher Weise eine Kolonisierung in den Tieren wie das unmarkierte Vwa-Plasmid des Stammes 1803V$^+$. Die plasmidfreien Mutanten beider Stämme waren kurze Zeit nach dem Wasserwechsel nicht mehr im Kot der Mäuse nachweisbar.

Offensichtlich war durch die Insertion von Tn 1 kein für die Virulenz der Organismen wesentliches Merkmal ausgeschaltet worden. Andererseits könnte dies auch einen Hinweis darauf geben, daß die auf dem Vwa-Plasmid lokalisierten

Virulenzeigenschaften in einem engen Zusammenhang untereinander stehen.

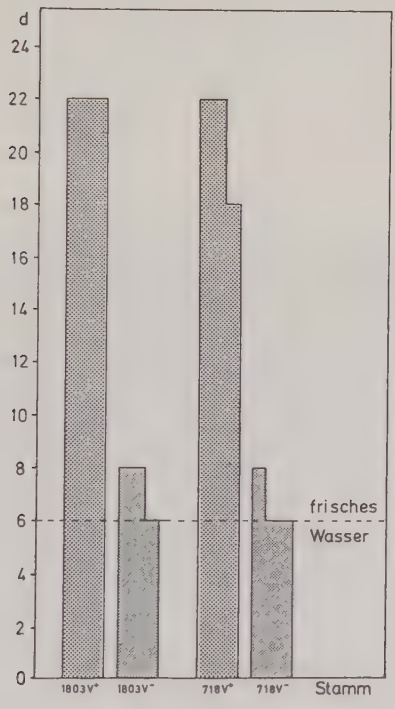


Abb. 41: Kolonisationsvermögen von Stamm 718V$^+$ im Maus-Diarrhöe-Modell im Vergleich mit Stamm 1803V$^+$ und den plasmidfreien Mutanten 718V$^-$ und 1803V$^-$
Ein Balken steht für jeweils drei Tiere, die Abstufungen kommen durch das unterschiedliche Verhalten einzelner Mäuse zustande.

8. Übertragung des Vwa-Plasmides auf E. coli HB 101

Die folgenden Versuche sollten Auskunft darüber geben, ob das Vwa-Plasmid prinzipiell auf andere Organismen übertragen und die Anwesenheit von Tn 1 als Selektionsmarker für das Vwa-Plasmid benutzt werden konnte. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Vwa-Plasmid konjugativ ist.

8.1. Versuch der Übertragung durch Konjugation

Über eine konjugative Übertragung des Vwa-Plasmides war bisher nicht berichtet worden. Die Schwierigkeiten lagen zum Teil an fehlenden selektionierbaren Markern, zum anderen bestand aber auch die Möglichkeit, daß das Plasmid nicht konjugativ war.
Da mit Tn 1 nun eine Markierung gegeben war, sollte der Versuch unternommen werden, das Plasmid in einen anderen Stamm hineinzukonjugieren.
Als Rezipient wurde E. coli-Stamm HB 101 eingesetzt, ein Stamm, der sich in Transferexperimenten als Rezipient bewährt hatte (Maniatis et al., 1982), da er keine wirtsspezifischen Modifikations- und Restriktionsenzyme besitzt. Der Stamm trägt eine chromosomal bedingte Streptomycinresistenz, die zur Gegenselektion verwendet werden konnte.
Donor war Stamm $718V^{+}$. Die Konjugation erfolgte wie bereits beschrieben auf TSA-Platten. Das Selektionsmedium (Iso-Sensitest-Agar) enthielt 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Streptomycin.
Auch nach mehrfacher Wiederholung des Versuches konnten keine Konjuganten isoliert werden. Offenbar ließ sich das Vwa-Plasmid nicht konjugativ übertragen. Die zweite Möglichkeit, daß eine Konjugation zwar stattgefunden hatte, das Plasmid aber im Rezipienten nicht repliziert oder exprimiert werden konnte, wurde für wenig wahrscheinlich gehalten, da HB 101 ein sehr weites Wirtsspektrum besitzt (Maniatis et al., 1982).

8.2. Versuch einer Mobilisierung mit Hilfe von $RP1_{ts}$

Für den Fall, daß das Vwa-Plasmid nicht selbst konjugativ ist, sollte versucht werden, das Plasmid mit Hilfe des konjugativen Plasmides $RP1_{ts}$ zu mobilisieren, oder unter Beteiligung von Tn 1 über die Bildung eines Kointegrates einen Transfer zu erzielen.
Als Donor wurde Y. enterocolitica-Stamm $1803V^{+}RP1_{ts}$, ein Stamm, der das Vwa-Plasmid und zusätzlich $RP1_{ts}$ beherbergte (s. Abb. 42), eingesetzt, als Rezipient wurde wieder E. coli HB 101 verwendet. Die Konjugation wurde wie oben erwähnt ausgeführt. Zur Selektionierung wurde das Konjugationsgemisch auf Iso ausplattiert,

dem je 25 µg/ml Tetracyclin und Kanamycin sowie je 100 µg/ml Ampicillin und Streptomycin zugesetzt worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen (bei 25 °C) wurden die gewachsenen Konjuganten isoliert und auf die Anwesenheit extrachromosomaler DNA hin überprüft. Von mehr als 300 untersuchten Konjuganten besaß keiner beide Plasmide oder ein Plasmid in der Größe eines möglichen Kointegrates. In sämtlichen Isolaten konnte lediglich $RP1_{ts}$ nachgewiesen werden (s. Abb. 42). Offenbar lag die Nachweisgrenze für einen eventuellen Kotransfer beider Plasmide weit unter der Konjugationsfrequenz von $RP1_{ts}$.

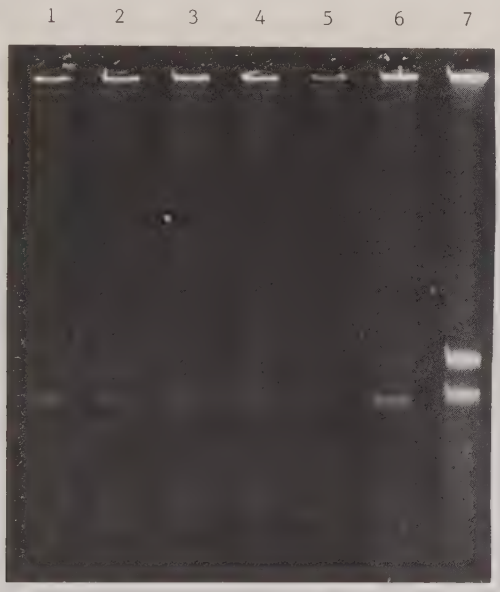


Abb. 42: Ergebnis der Plasmidanalyse nach dem Mobilisierungsversuch
Spalten 1 bis 6: DNA aus Konjuganten; Spalte 7: Vwa und $RP1_{ts}$ aus $1803V^{+}RP1_{ts}$

8.3. Versuch der Übertragung durch Transformation

Da mit Hilfe einer Konjugation keine Übertragung des Vwa-Plasmides hatte erfolgen können, wurde nun versucht, den E. coli-Stamm HB 101 mit Plasmid-DNA aus dem Yersinia-Stamm $718V^{+}$ zu transformieren.
Die Transformation erfolgte gemäß dem im Methodenteil angegebenen Verfahren. Das Selektionsmedium (Iso-Sensitest-Agar) enthielt 100 µg/ml Ampicillin und

100 µg/ml Streptomycin. Obwohl das Vwa-Plasmid zu groß war, um annehmbare Transformationsfrequenzen zu erzielen, gelang es, Transformanten zu isolieren, die die Ampicillinresistenz angenommen hatten. Diese Transformanten agglutinierten nicht mit Y. enterocolitica-Antiserum O:3, es handelte sich also nicht um versehentlich isolierte Donorzellen. Eine Untersuchung der extrachromosomalen DNA zeigte, daß die Isolate ein Plasmid enthielten, welches ein wenig größer als das Vwa-Plasmid war und im Gel die gleiche Laufstrecke wie das Plasmid von 718V$^+$ zurücklegte (s. Abb. 43).

Abb. 43: Gelelektrophoretische Auftrennung von E. coli HB 101-Zellen, die mit dem Plasmid aus Stamm 718V$^+$ transformiert worden waren
Spalte 1: Vwa aus Stamm 1803V$^+$; Spalte 2: Transformant von E. coli HB 101;
Spalte 3: RP1$_{ts}$; Spalte 4: Transformant von E. coli HB 101

Ein Vergleich der Restriktionsmuster ergab, daß es sich bei dem Plasmid in den Transformanten von HB 101 tatsächlich um das gleiche Plasmid wie in dem Stamm 718V$^+$ handelte.

Der Versuch zeigte zum einen, daß das Vwa-Plasmid trotz seiner Größe durch eine Transformation übertragen werden konnte, zum anderen, daß die von Tn 1 vermittelte ß-Lactamase-Aktivität zusammen mit dem Vwa-Plasmid übertragen wurde. Damit

hatte sich Tn 1 als Selektionsmarker für das Vwa-Plasmid bewährt. Bei dem Ampicillin-empfindlichen E. coli war kein Hintergrund aufgetreten.

Gleichzeitig untermauerte die erfolgreiche Transformation von HB 101 mit diesem Plasmid, daß das Vwa-Plasmid zumindest in der markierten Form nicht konjugativ ist.

9. Expression von pMB 718 in HB 101

9.1. Ausprägung des Koloniedimorphismusses

Der Transformant HB 101V$^+$ wuchs bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C deutlich kleiner als der Elternstamm HB 101 (s. Abb. 44).

Abb. 44: Unterschiedliche Kolonieformen bei dem Transformanten HB 101V$^+$
Die große Kolonie (Pfeil) hatte das Plasmid wieder verloren.

9.2. Fähigkeit zur Autoagglutination

Die Transformantenzellen autoagglutinierten zwar, bildeten jedoch nicht immer ein so charakteristisches Sediment am Boden des Röhrchens, wie es bei Stamm 1803V$^+$ zu beobachten gewesen war (vgl. Abb. 20). Die Nährlösung war nicht klar,

sondern getrübt, jedoch grobflockiger als bei dem Elternstamm.

9.3. Calciumbedürftigkeit

Die Abhängigkeit von Ca^{2+}-Ionen war bei dem Transformanten ebenfalls nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Elternstamm $718V^+$. Auf MGOX-Agar traten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C viel mehr Kolonien auf als bei calciumabhängigen Yersinia-Stämmen. Zwar wuchsen bei 25°C noch eine Reihe von kleinen plasmidtragenden Kolonien nach, jedoch besaßen auch einige der größeren Kolonien das Vwa-Plasmid (s. Abb. 45).

Abb. 45: Wachstum von Transformant HB $101V^+$ auf MGOX-Agar nach Inkubation bei 37°C und Weiterbebrütung bei 25°C

9.4. Resistenz von HB $101V^+$ gegenüber Humanserum

Der Transformant HB $101V^+$ wurde zusammen mit dem Stamm $1803V^+$, der als Kontrolle diente, getestet. Vor dem Versuch wurde die Anwesenheit des Vwa-Plasmides bei beiden Stämmen überprüft.
Wie aus der Abb. 46 hervorgeht, starb der E.coli-Stamm trotz des Vwa-Plasmides sofort ab, während der Kontrollstamm den Versuch erwartungsgemäß überlebte.
Die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem wurde in E. coli offenbar nicht exprimiert.

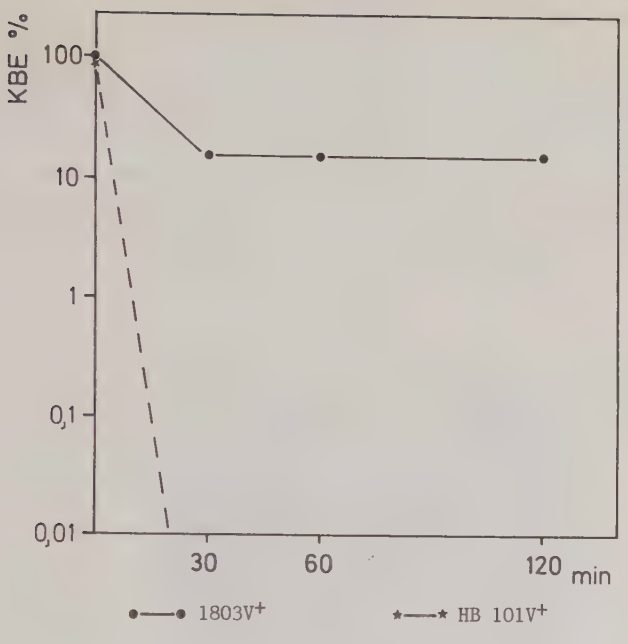


Abb. 46: Verhalten von HB 101V$^+$ gegenüber Humanserum im Vergleich zu dem Kontrollstamm 1803V$^+$

10. Eignung von Tn 1 als Marker gegenüber Y. enterocolitica

Bevor der Versuch unternommen wurde, das Vwa-Plasmid innerhalb der Species Y. enterocolitica zu übertragen, sollte überprüft werden, ob Tn 1, bzw. die Resistenz gegen Ampicillin, hier als Marker überhaupt Verwendung finden konnte. Die relativ hohe natürliche Resistenz der Organismen gegenüber ß-Lactamantibiotika (s. Tabelle 14) sprach zunächst dagegen. Der in einem solchen Fall zu erwartende Hintergrund hätte die Selektion auf Transferereignisse sehr erschwert, wenn nicht unmöglich gemacht.

Es war jedoch aufgefallen (s. Versuch 7), daß die Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C empfindlicher reagierten als bei 25° bis 26°C. (Die MHK-Bestimmung in Versuch 4 war bei 25°C erfolgt.) Dieser Effekt sollte näher untersucht werden.

Frische Übernachtkulturen der Stämme 1803V$^+$ und 718V$^+$ wurden verdünnt und auf jeweils 2 Platten mit Vollmedium (Iso-Sensitest-Agar) und 2 Platten mit Ampicillin-haltigem Medium (Iso-Sensitest-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Eine der beiden Platten wurde bei 25°C, die andere bei 37°C bebrütet (18 h). Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt. Sie zeigten, daß unter den gewählten Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 25°C mit einem ziemlich hohen Hintergrund von 8 x 10^4 Zellen zu rechnen war. Erfolgte die Inkubation bei 37°C, traten diese Probleme nicht auf. Bei dem Stamm 718V$^+$, der ja das Transposon Tn 1 in seinem Vwa-Plasmid trug, wurde dagegen die Ampicillinresistenz temperaturunabhängig ausgeprägt.

Tabelle 16: Empfindlichkeit von Y. enterocolitica gegenüber Ampicillin in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Stamm	Temperatur	KBE	
		Iso	Iso/Amp
1803V$^+$	25°C	8 x 10^7	8 x 10^4
1803V$^+$	37°C	3 x 10^7	-
718V$^+$	25°C	3 x 10^8	2 x 10^8
718V$^+$	37°C	9 x 10^7	7 x 10^7

11. Entwicklung eines Transformationsverfahrens für Y. enterocolitica-Stamm B85AN

Eine erfolgreiche Transformation von Y. enterocolitica mit Plasmid-DNA war bisher noch nicht veröffentlicht worden und offenbar mit Schwierigkeiten verbunden (Laroche et al., 1984; Heesemann und Laufs, 1983). Da das Vwa-Plasmid jedoch nicht konjugativ zu sein schien, mußte der Versuch unternommen werden, ein geeignetes Transformationsverfahren bzw. einen transformierbaren Stamm zu finden. Zur Erprobung verschiedener Methoden wurde mit RSF 1010 ein Plasmid ausgewählt, welches bisher erfolgreich Bakterien aus unterschiedlichen Species transformiert hatte. Das 8,9 Kb große Plasmid ist nicht konjugativ, vermittelt Resistenzen gegen Streptomycin und Sulphonamide und besitzt ein weites Wirtsspektrum (Barth und Grinter, 1974; Nagahari und Sakaguchi, 1978; David et al., 1981; Bagdasarian et al., 1981).
Donorstamm für RSF 1010 war E. coli-Stamm SK 1592 (Kushner, 1978), als Empfänger war Y. enterocolitica-Stamm B85AN, eine Nalidixinsäure-resistente Mutante des

Stammes B85A, vorgesehen.

Die zunächst erprobte Methode nach Kushner (1978) hatte nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt, daher wurde eine Modifikation der Methode nach Lederberg und Cohen (1974) erarbeitet. Nach mehreren Versuchen, bei denen vor allem Inkubationzeiten variiert und auf verschiedene Weise gereinigte DNA eingesetzt worden waren, gelang es, Transformanten zu isolieren. Die Transformationsfrequenz lag bei 4×10^{-7}. Die Selektion erfolgte auf Iso-Sensitest-Medium mit Zusatz von Streptomycin (250 µg/ml) und Sulfamethoxazol (250 µg/ml). Bei der Selektionierung trat kein Hintergrund auf, wenn beide Antibiotika verwendet wurden. Eine Analyse der Plasmid-DNA zeigte, daß RSF 1010 in B85AN gegangen war (s. Abb. 47).

Abb. 47: Transformation von B85AN mit dem Plasmid RSF 1010
Spalte 1: Donorstamm SK 1592 mit RSF 1010 (Pfeil); Spalte 2: Rezipientenstamm B85AN ohne Plasmid-DNA; Spalten 3 und 4: Transformanten mit RSF 1010

Die Versuche hatten gezeigt, daß folgende Faktoren die Transformierbarkeit von Y. enterocolitica günstig beeinflußten: 1. Die OD_{550} der Rezipientenkultur sollte einen Wert von 0,6 nicht überschreiten, um eine geringe Zelldichte während der Calciumbehandlung zu gewährleisten. 2. Die Calciumbehandlung zur Induktion einer künstlichen Kompetenz sollte mindestens 12 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden dauern. 3. Die DNA sollte von niedermolekularen Substanzen befreit werden, z.B. mittels Zentrifugation durch Sephadex G50. Eine Reinigung der DNA mit Phenol brachte nach den vorliegenden Befunden keine Vorteile. 4. Die Rezipientenzellen wurden nach dem Transformationsversuch über Nacht in frischem Vollmedium gehalten, bevor die Aussaat auf die Selektivplatten erfolgte.

12. Übertragung von pMB 718 auf den Lebensmittelstamm B85AN

Die generelle Möglichkeit, das Vwa-Plasmid mittels Transformation zu übertragen, war bereits mit dem Transfer auf E. coli demonstriert worden (s. Versuch 9). Nachdem nun ein transformierbarer Stamm und eine funktionsfähige Methode zur Verfügung standen, sollte versucht werden, das Vwa-Plasmid auf einen nicht pathogenen Y. enterocolitica-Stamm zu übertragen.
Die zur Transformation verwendete DNA stammte von Y. enterocolitica-Stamm $718V^+$. Als Rezipient diente der Lebensmittelstamm B85AN, eine Nalidixinsäure-resistente Mutante von B85A. Die Transformation wurde genau nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren vorgenommen. Zur Selektion wurde Iso-Sensitest-Agar mit einem Zusatz von Nalidixinsäure (20 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) eingesetzt. Obwohl der Rezipient alleine nicht auf diesem Medium wachsen konnte, trat bei den Platten mit dem Transformationsgemisch ein recht hoher Hintergrund auf. Infolge dieses Hintergrundes konnte die genaue Transformationsfrequenz nicht bestimmt werden. Von 200 isolierten Klonen enthielten 4 ein Plasmid in der Größe des Vwa-Plasmides (s. Abb. 48).
Die isolierten Transformanten zeigten keine Autoagglutination mit Y. enterocolitica-Antiserum O:3, womit eine zufällige Verwechslung mit dem Spender ausgeschlossen werden konnte.
Um ganz sicher zu sein, daß es sich bei dem in den Transformanten auftretenden Plasmid um pMB-718 handelte, wurde das Plasmid mit den Enzymen Eco RI und Hind III verdaut. Ein Vergleich der Schnittmuster zeigte, daß es sich bei dem aus B85AN isolierten Plasmid um das mit Tn 1 markierte Vwa-Plasmid Vwa-718 handelte (s. Abb. 49). Die Transformanten erhielten die Bezeichnung $B85ANV^+$.

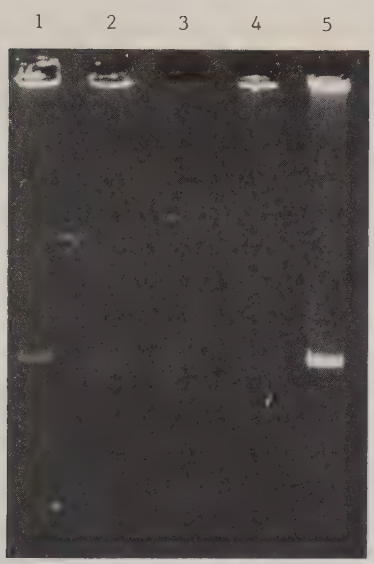


Abb. 48: Analyse der Plasmid-DNA aus Transformanten des Stammes B85AN
Spalten 1 bis 4: Transformanten; Spalte 5: Plasmid pMB 718 aus Stamm 718V$^+$

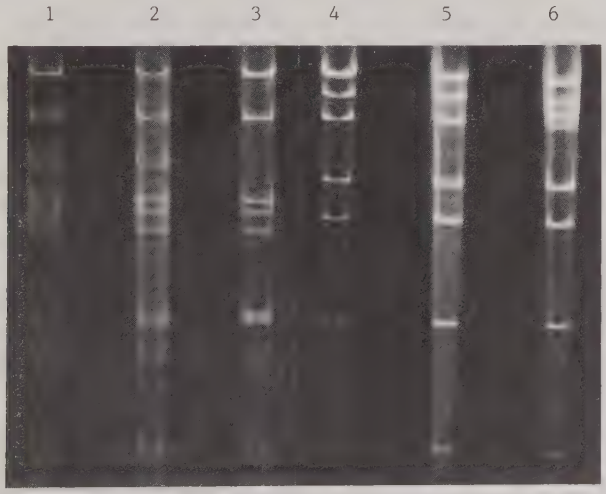


Abb. 49: Vergleich der Schnittmuster von Plasmiden aus den Stämmen B85ANV$^+$, 718V$^+$ und 1803V$^+$
Spalte 1: B85ANV$^+$ verdaut mit Hind III; Spalte 2: 718V$^+$ verdaut mit Hind III;
Spalte 3: 1803V$^+$ verdaut mit Hind III; Spalte 4: B85ANV$^+$ verdaut mit Eco RI;
Spalte 5: 718V$^+$ verdaut mit Eco RI; Spalte 6: 1803V$^+$ verdaut mit Eco RI.

13. Expression des Vwa-Plasmides in Stamm B85ANV$^+$

Die erfolgreiche Übertragung des Vwa-Plasmides auf einen zum apathogenen Serotyp 5A gehörenden Stamm bietet die Voraussetzungen zur Untersuchnug der Frage, inwieweit das Plasmid tatsächlich an der Virulenz der Stämme beteiligt ist. Daraus können sich Anhaltspunkte zur Beurteilung der pathogenen Potenz von phänotypisch apathogenen Stämmen ergeben, wie sie oft in Lebensmitteln und in der Umwelt anzutreffen sind.
So war es beispielsweise von Interesse, ob die Eigenschaften, die bei den virulenten Stämmen nur in Anwesenheit des Vwa-Plasmides auftraten, rein extrachromosomal determiniert werden und infolgedessen auch übertragen werden können, oder ob eine Beteiligung des Chromosoms erforderlich ist. Die erhaltenen Transformanten wurden daher auf die Ausprägung plasmidbedingter Merkmale untersucht und mit dem Verhalten des nicht transformierten, plasmidfreien Elternstammes B85ANV$^-$ verglichen. In den Vergleich wurden auch die virulenten Stämme 1803V$^+$ und 718V$^+$ sowie deren plasmidlose Mutanten 1803V$^-$ und 718V$^-$ einbezogen.

13.1. Koloniedimorphismus

Der Elternstamm B85ANV$^-$ wuchs bei einer Inkubationstemperatur von 37°C auf TSA in großen flachen Kolonien. Der Transformant zeigte unter den gleichen Bedingungen auf dem gleichen Medium viel kleinere erhabene Kolonien (s. Abb. 50).

Abb. 50: Koloniedimorphismus bei B85ANV$^+$ bei 37°C
Die kleinen Kolonien besaßen das Vwa-Plasmid, die großen waren plasmidfrei.

13.2. Calciumbedürfigkeit bei 37°C

Eine Abhängigkeit von Ca^{2+}-Ionen ließ sich für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lebensmittelstämme ausschließen (vgl. Tabelle 9). Dies galt auch für den Stamm B85A. Die mit dem Vwa-Plasmid transformierten Zellen des Stammes B85AN zeigten das Bedürfnis nach Calcium jedoch sehr deutlich, wie auf Abb. 51 zu sehen ist. Wurden die Transformanten bei 37°C auf Calciummangelmedium (MGOX) inkubiert, wuchsen innerhalb von 18 Stunden nur einige große Kolonien. Bei der Fortsetzung der Bebrütung bei 25°C entwickelten sich viele kleine Kolonien.

Abb. 51: Calciumbedürftigkeit bei den Transformanten $B85ANV^+$ in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur
Eine Platte mit Calciummangelmedium (MGOX) wurde ü.N. bei 37°C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden markiert (s. Pfeile), und die Bebrütung wurde bei 25°C fortgesetzt. Nach 12 Stunden hatten sich auch die Calcium-abhängigen Kolonien entwickelt.

13.3. Fähigkeit zur Autoagglutination bei $B85ANV^+$

Zur Durchführung des Autoagglutinationstestes wurden große und kleine Kolonien von MGOX-Agar isoliert und in LB-Medium überimpft. Als Kontrollen wurden die Stämme $1803V^+$, $1803V^-$, $718V^+$ und $718V^-$ ebenfalls mitüberprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 52 festgehalten. Die jeweils plasmidlosen Organismen trübten das Medium gleichmäßig, während sich die plasmidhaltigen Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C als flockiges Sediment am Boden des Röhrchens absetzten.

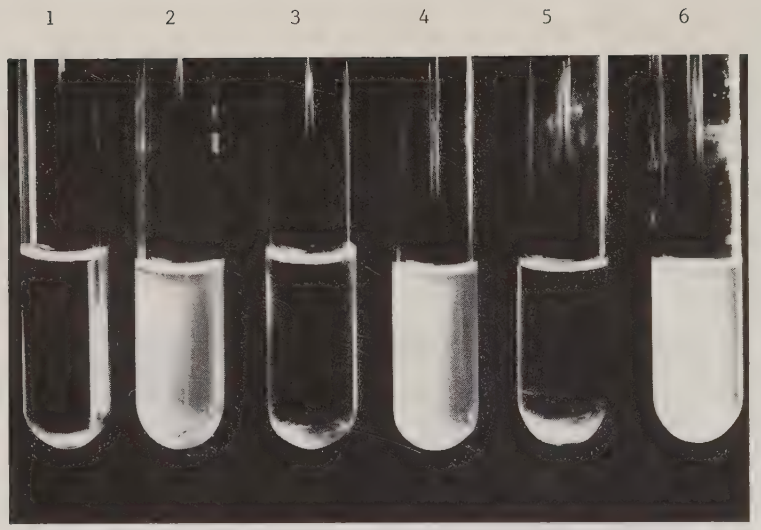


Abb. 52: Fähigkeit zur Autoagglutination bei dem Transformanten B85ANV$^+$ im Vergleich zu seinem Elternstamm und anderen plasmidtragenden und plasmidfreien Stämmen
Röhrchen 1: B85ANV$^+$; Röhrchen 2: B85ANV$^-$; Röhrchen 3: 718V$^+$; Röhrchen 4: 718V$^-$; Röhrchen 5: 1803V$^+$; Röhrchen 6: 1803V$^-$.

Dazu muß angemerkt werden, daß die Ergebnisse dieses Testes nicht immer so eindeutig ausfielen. Die transformierten Zellen autoagglutinierten zwar eindeutig, jedoch zeigten auch plasmidfreie Zellen von Lebensmittelstämmen u.U. ein solches Verhalten (vgl. Versuch 3.5.). Die Gründe hierfür sind noch unklar.
Ein positiver Autoagglutinationstest alleine reicht deshalb bei den Transformanten nicht zum Nachweis des Vwa-Plasmides aus.

13.4. Verhalten des Transformanten B85ANV$^+$ gegenüber Humanserum

Die Fähigkeit, der bakteriziden Wirkung des im Serum aktiven Komplementsystems zu widerstehen, war plasmidtragenden Zellen vorbehalten gewesen (vgl. Versuch 3.5.). Im Falle von E. coli HB 101V$^+$ war die Serumresistenz nicht ausgeprägt worden, obwohl das Vwa-Plasmid in dem Stamm nachgewiesen worden war. Ob die Ursache dafür in der Unfähigkeit von E. coli lag, die entsprechenden Determinaten zu exprimieren, oder ob diese Eigenschaft nicht mit dem Plasmid übertragen wurde,

sollte der nächste Versuch zeigen. Um ein Versagen des Serums auszuschließen, wurden die Stämme 1803V$^+$ und 718V$^+$ ebenfalls getestet. Parallel wurde auch der nicht transformierte Stamm B85ANV$^-$ untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 aufgezeichnet.

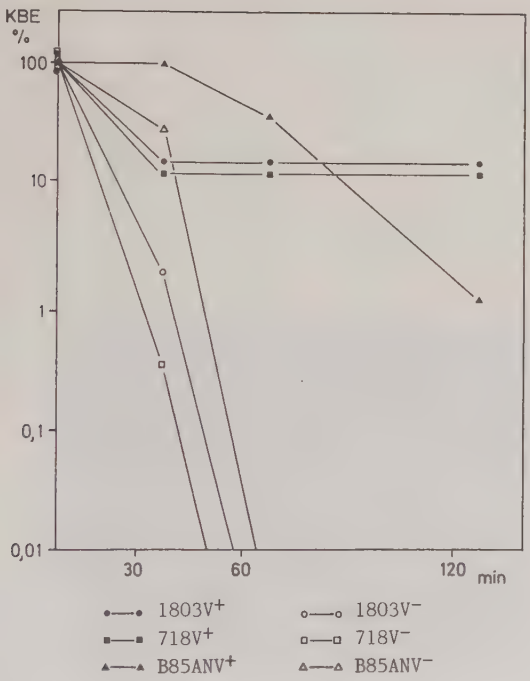


Abb. 53: Serumresistenz des transformierten und nicht transformierten Lebensmittelstammes B85ANV$^+$ bzw. B85ANV$^-$ im Vergleich zu den isogenen Paaren 1803V$^+$/1803V$^-$ und 718V$^+$/718V$^-$

Der nicht transformierte Lebensmittelstamm starb, wie die plasmidfreien Mutanten, erwartungsgemäß sehr schnell ab. Die plasmidhaltigen Stämme 1803V$^+$ und 718V$^+$ verhielten sich wie in Versuch 3.5. bzw. 8.4., nach einer leichten Reduktion zu Beginn des Versuches blieb die Zellzahl konstant. Interessant war das Verhalten des Transformanten. Während der ersten halben Stunde blieb die Zellzahl

unverändert. Nach 60 min war ein leichter Rückgang zu verzeichnen, ähnlich dem der beiden anderen Plasmidträger. Gegen Ende des Versuches, nach 120 min, war die Zellzahl erneut abgesunken, der Stamm hatte jedoch die gesamte Versuchsdauer überlebt. Dies zeigt eindeutig, daß mit dem Vwa-Plasmid auch ein Schutz gegenüber der bakteriziden Wirkung des Humanserums übertragen worden war.

13.5. Verhalten des Transformanten im Tierversuch

Als letztes sollte geprüft werden, wie die Kolonisationsfähigkeit des Transformanten B85ANV$^+$ sich gegenüber dem nicht transformierten Elternstamm durch den Erhalt des Plasmides geändert hatte. Auch bei diesem Versuch wurden die Stämme 1803V$^+$, 1803V$^-$, 718V$^+$ und 718V$^-$ als Kontrollen eingesetzt.
Alle getesteten Stämme wurden vor Versuchsbeginn auf die An- bzw. Abwesenheit ihrer Plasmide hin überprüft (s. Abb 54).

Abb. 54: Plasmidmuster der im Tierversuch eingesetzten Stämme
Spalte 1: B85ANV$^+$; Spalte 2: B85ANV$^-$; Spalte 3: 718V$^+$; Spalte 4: 718V$^-$; Spalte 5: 1803V$^+$; Spalte 6: 1803V$^-$

Die Ergebnisse des über 24 Tage dauernden Experimentes sind in Abb. 55 veranschaulicht. Die plasmidfreien Mutanten und der nicht transformierte Lebensmittelstamm konnten nach wenigen Tagen, spätestens jedoch 2 Tage nach dem Wasserwechsel, nicht mehr im Kot der Tiere nachgewiesen werden. Alle 3 mit dem Stamm 1803V$^+$ infizierten Tiere schieden die Organismen über 22 Tage hinweg aus. In zwei der drei mit dem markierten Stamm beimpften Mäuse konnten die Bakterien

über den gleichen Zeitraum nachgewiesen werden. Das dritte Tier beherbergte den Stamm über 18 Tage. Der transformierte Lebensmittelstamm konnte 18 Tage lang aus allen drei Tieren reisoliert werden.
Die Rückisolierungen wurden sehr sorgfältig durchgeführt und überprüft, da sie das wichtigste Kriterium für die Dauer der Kolonisation waren.

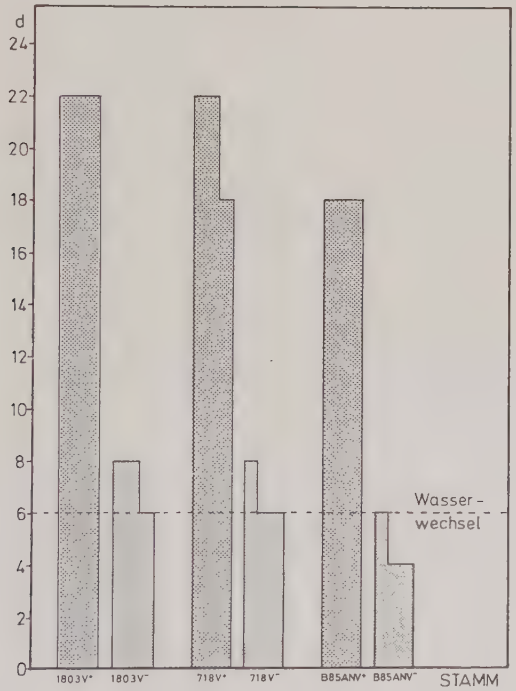


Abb. 55: Nachweis von Y. enterocolitica-Stämmen im Kot von Mäusen
B85ANV$^+$ und B85ANV$^-$ sind der transformierte Stamm und sein Elternstamm. Die beiden übrigen Stämmepaare dienten der Kontrolle. Ein Balken steht für jeweils 3 Mäuse, die Abstufungen kommen durch das unterschiedliche Verhalten einzelner Tiere zustande.

Auch die übrigen im Tierversuch mit plasmidtragenden Stämmen beobachteten Symptome (vgl. Versuch 3.5.) traten bei den mit dem Transformanten infizierten Mäusen auf. Tabelle 17 gibt hierzu einen Überblick.

Tabelle 17: Verhalten des Transformanten und der Vergleichsstämme im Maus-Diarrhöe-Modell

Stamm	Serotyp	Diarrhöe/ weicher Kot	Nachweis von Bakterien (d)	Tod	andere Symptome
1803V$^+$	O:3	+	+	-	Verstopfung*
1803V$^-$	O:3	-	-	-	-
718V$^+$	O:3	+	+	+	Verstopfung
718V$^-$	O:3	-	-	-	-
B85ANV$^+$	5A	+	+	+	Verstopfung
B85ANV$^-$	5A	-	-	-	-

* Die Tiere hatten vorübergehend Schwierigkeiten, Kot abzugeben (vgl. 3.5.).

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen Transformant, Donorstamm, Rezipientenstamm und dem ursprünglichen Wildtypstamm zeigten, daß der Transformant alle vorher mit dem Vwa-Plasmid in Verbindung gebrachten Eigenschaften mit dem Plasmid übernommen hatte (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Charakteristika von Transformant und Elternstämmen

Elternstämme	MGOX	Aggl	Serum-resistenz	Kolonisierung in Mäusen	Plasmid
1803V$^+$	+	+	+	+	+
718V$^+$	+	+	+	+	+
B85ANV$^-$	-	-	-	-	-
Transformant					
B85ANV$^+$	+	+	+	+	+

Damit konnte nicht nur gezeigt werden, daß das Vwa-Plasmid erfolgreich auf andere Yersinia-Stämme übertragen werden kann, sondern daß die dem Plasmid zugeschriebenen Eigenschaften auch in nicht pathogenen Serotypen exprimiert werden können.

IV. DISKUSSION

" Ein äußerst erfolgreicher modus operandi in der Wissenschaft ist es, ein Experiment durchzuführen, und danach zu entscheiden, welches Problem gelöst worden ist. Der umgekehrte Weg, einen Versuch zu planen, um eine vorgegebene Frage zu beantworten, kann viel schwieriger sein. Unglücklicherweise kann die letzte Vorgehensweise von denen, die sich mit Infektionskrankheiten beschäftigen, nicht umgangen werden..." schreibt R.R. Brubaker (1972) in einem Übersichtsartikel über die Biochemie und Genetik der Virulenz des Genus Yersinia.

Die Virulenz von Bakterien ist das Ergebnis von vielen verschiedenen Eigenschaften, die oft zu unterschiedlichen Schritten in einer Reihe von Ereignissen beitragen, die wir als Infektion wahrnehmen (Sparling, 1983). Für viele bakterielle Infektionen lassen sich gemeinsame Stadien aufzeigen, in denen die Anheftung, die Proliferation, die Schädigung und Zerstörung von Geweben, die Invasion und schließlich die Ausbreitung der Bakterien im gesamten Wirtsorganismus eine wesentliche Rolle spielen. Pathogene Mikroorganismen müssen jedoch nicht notwendigerweise alle diese Stufen durchlaufen, um eine Krankheit hervorrufen zu können. So breitet sich im Falle von Corynebacterium diphtheriae zwar das Toxin, nicht aber das Bakterium selbst aus. Neisseria gonorrhoeae kann sich, obwohl nur für ganz bestimmte Zelltypen invasiv, im Wirt ausbreiten, wenn es den Organismen gelingt, in den Blutstrom zu kommen.
Das Erscheinungsbild der Virulenz setzt sich also aus vielen ineinandergreifenden Variablen zusammen, an denen sowohl das Bakterium als auch der Wirt beteiligt ist. Ein gemeinsames Merkmal bakterieller Virulenz ist die Fähigkeit, die wirtseigenen Abwehrmechanismen zu überwinden. Die Beschaffenheit dieses Abwehrsystems, die in einer Vielzahl von spezifischen und nicht spezifischen Reaktionen ihren Niederschlag findet, ist maßgeblich für die Ausprägung der Virulenz verantwortlich. Kleinere Veränderungen in der Immunabwehr des Wirtes können dabei große Auswirkungen auf die Virulenz pathogener Organismen haben (Sparling, 1983).
Ganz besonders sind hiervon fakultativ pathogene Bakterien betroffen. Generalisierende Aussagen über die Pathogenität von Mikroorganismen können daher zu Fehleinschätzungen führen. Erschwert werden Untersuchungen im Zusammenhang mit Pathogenitätsmechanismen oft auch durch das Fehlen von Versuchsmodellen, mit deren Hilfe sich die Reaktionen des Wirtes auf einzelne Virulenzfaktoren veranschaulichen ließen.

Der im Hinblick auf seine Virulenzeigenschaften am besten untersuchte Vertreter des Genus Yersinia ist Y. pestis. Für fünf verschiedene Faktoren ist bisher eine entscheidende Beteiligung an der Virulenz dieser Bakterien nachgewiesen worden (Burrows, 1963; Brubaker, 1972 und Brubaker, 1983): Die Produktion der sogenannten Virulenzantigene V und W (vwa^+), des Fraktion I-Antigens (fra^+), von Pesticin 1 (pst^+), die Synthese endogener Purine (pur^+) und die Ausbildung von pigmentbindenden Oberflächenstrukturen (pgm^+).
Y. pseudotuberculosis besitzt nur 2 der 5 vorgenannten Virulenzfaktoren: die Fähigkeit zur Synthese der Virulenzantigene V und W und zur Bildung endogener Purine (Burrows und Bacon, 1960; Brubaker, 1972).
Für Y. enterocolitica konnten weder das Fl-Antigen noch die Synthese endogener Purine nachgewiesen werden (Carter et al., 1980). Auch die Bildung von Pesticin oder eines ähnlichen Bacteriocines wurde nicht festgestellt. Das Auftreten eines temperaturabhängigen Bacteriocins wurde von Bottone (1979) lediglich im Zusammenhang mit Y. intermedia, einem avirulenten Organismus, beschrieben. Eigene Untersuchungen ließen dagegen weder bei Patientenstämmen noch bei Lebensmittelstämmen, Y. intermedia eingeschlossen, die Fähigkeit zur Bacteriocinproduktion erkennen (Hauröder, 1980).
Auch Une und Brubaker (1984) wiesen darauf hin, daß der Phänotyp pst^+ auf die Species Y. pestis beschränkt sei. Die Empfindlichkeit von Y. enterocolitica-Stämmen gegenüber Pesticin 1 scheint im Gegensatzt zu Y. pestis in keiner Verbindung mit der Virulenz der Organmismen zu stehen (Une und Brubaker, 1984).

Die Bindung von Pigmenten wie Hämin und Kongorot ist bei Y. pestis mit der Fähigkeit verknüpft, Fe^{2+}-Ionen akkumulieren zu können (Jackson und Burrows, 1956; Perry und Brubaker, 1977). Eine einfache Methode, pgm^+- von pgm^--Zellen zu unterscheiden, ist ihre Anzucht auf Kongorot-Agar (Surgalla und Beeley, 1969).
Prpic et al. (1983) benutzten ein Kongorot-Medium, um zwischen virulenten und nicht virulenten Y. enterocolitica-Isolaten zu unterscheiden. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme erwies sich dieses Differenzierungsverfahren als wenig brauchbar. Selbst der hochvirulente Stamm WA 314, der nach Angaben dieser Autoren tiefrote Kolonien bildete, blieb auf dem nach ihren Anweisungen hergestellten Medium hell (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit den Befunden von Perry und Brubaker (1977) und Une und Brubaker (1984), die Y. pseudotuberculosis und Y. enterocolitica dem Phänotyp pgm^- zuordneten.

Die Ausprägung der Eigenschaft vwa^+ ist der bisher einzige Virulenzfaktor, den Y. enterocolitica mit Y. pseudotuberculosis und Y. pestis gemeinsam hat.

Burrows (1956) entdeckte als erster die Produktion eines Antigens bei virulenten Stämmen von Y. pestis. Da nur virulente Zellen dieses Antigen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bildeten, nannte er es Vi-Antigen, Virulenzantigen. Als kurze Zeit später ein zweites, unter den gleichen Bedingungen freigesetztes Antigen gefunden wurde (Burrows und Bacon, 1956), erhielt es die Bezeichnung W-Antigen, das Vi-Antigen wurde in V-Antigen umbenannt. Beide Antigene wurden bevorzugt in belüfteten Kulturen, bei einer Temperatur von 37°C, nicht jedoch bei Raumtemperatur synthetisiert (Burrows und Bacon, 1956).
Parallel dazu fanden Kupferberg und Higuchi (1958) und Higuchi et al. (1959), daß virulente Stämme von Y. pestis zum Wachstum unter diesen Bedingungen (37°C und Belüftung) auf die Zufuhr von Ca^{2+}-Ionen angewiesen waren. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen in einer Konzentration von 20 mM noch verstärkt. Bei avirulenten Stämmen oder bei einer Reduktion der Inkubationstemperatur trat eine solche Calciumabhängigkeit nicht auf.
Mutanten, die den Phänotyp vwa^- angenommen hatten, hatten auch ihre Calciumbedürftigkeit verloren (Surgalla, 1960). Untersuchungen zur Biosynthese der V- und W-Antigene deckten auf, daß Calcium in einer Konzentration von 25 mM die Produktion dieser Antigene unterdrückte (Brubaker und Surgalla, 1964). Eine optimale Syntheserate wurde überraschenderweise unter genau den Bedingungen erzielt, unter denen die Zellen selbst im Wachstum stagnierten ($Mg^{2+} \geq 25$ mM, $Ca^{2+} < 25$ mM) (Lawton et al., 1963; Brubaker und Surgalla, 1964).
Die Bildung der V- und W-Antigene in Y. pseudotuberculosis, die erstmals von Burrows und Bacon (1960) nachgewiesen worden war, erfolgte gleichfalls temperaturabhängig und unter Calciummangelbedingungen (Brubaker, 1967). Vwa^--Mutanten von Y. pseudotuberculosis zeigten dabei neben veränderten Calciumansprüchen, im Gegensatz zu Y. pestis, auch eine Änderung der Koloniemorphologie (Burrows und Bacon, 1960), die aber nicht auf Variationen in der O-Antigenstruktur zurückgeführt werden konnte (Brubaker, 1972).
Variationen in der Koloniemorphologie kommen auch bei anderen pathogenen Bakterien wie Streptococcus pneumoniae und Shigella vor. Meist unterscheiden sich beide Kolonietypen u.a. in ihrer Virulenz, wobei einer Abwandlung der LPS-Struktur eine entscheidende Rolle zukommt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenstämme von Y. enterocolitica konnte bei einer Inkubationstemperatur von 37°C auf TSA eine Aufspaltung in zwei Kolonietypen beobachtet werden.
Mazigh et al. bestätigten diesen Befund, allerdings konnten diese Autoren die Differenzierung nicht auf TSA, sondern nur auf einem speziellen, nährstoffarmen

Medium vornehmen (Mazigh et al., 1983).
Für Y. enterocolitica-Stämme des Serotyps O:8 gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Koloniemorphologie und der Anwesenheit eines 60-72 Kb großen Plasmides (Lazere und Gemski, 1980; Portnoy et al., 1981; Lazere und Gemski, 1983). Dies konnte auch für die in Bonn isolierten Stämme bestätigt werden. Die Untersuchung von 26 Patienten- und 8 Lebensmittelstämmen auf die Anwesenheit von Plasmiden zeigte, daß in Stämmen des Serotyps O:3 und des Serotyps O:9, bei denen eine Kolonieaufspaltung auftrat, auch ein Plasmid vorhanden war. Die Plasmidträger bildeten kleine gewölbte Kolonien, während die plasmidlosen Zellen in großen flachen Kolonien wuchsen. Das beständige Aufsplitten der Stämme in große flache und kleine gewölbte Kolonien ließ eine hohe Verlustrate für dieses Plasmid vermuten.
Die Stämme des Serotyps 5A sowie die beiden nicht typisierten Stämme prägten ungeachtet der Anwesenheit eines Plasmides keinen Koloniedimorphismus aus. Die Plasmide dieser Stämme unterschieden sich in ihrer Größe allerdings voneinander sowie von den Plasmiden der Patientenstämme.

In den Patientenstämmen beherbergten die Vertreter eines Serotyps jeweils ein Plasmid gleicher Größe. Untereinander unterschieden sich diese Plasmide nur um 3 Kb. Eine Restriktionsanalyse verdeutlichte zwei wesentliche Fakten:
1. Die getesteten Plasmide eines Serotyps wurden bei der Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI, Eco RI und Hind III in ein einheitliches Fragmentmuster zerlegt.
2. Die Plasmide der Serotypen O:3, O:9 und O:8 besaßen eine große Anzahl gemeinsamer Fragmente, ein Hinweis auf weitgehende Homologien.
Portnoy et al. (1981) stellten für die von ihnen untersuchten Stämme ebenfalls bedeutende Ähnlichkeiten hinsichtlich der Plasmide fest. Angaben dieser Autoren zufolge waren die Gemeinsamkeiten bei Stämmen, die aus der gleichen Gegend stammten, am größten.
Nach den hier vorliegenden Ergebnissen hat die Herkunft der Stämme keine so überragende Bedeutung. Das Plasmid eines in Kanada isolierten Stammes stimmte hinsichtlich der Restriktionsfragmente völlig mit Plasmiden des gleichen Serotyps, die in Bonn isoliert worden waren, überein.
Schnittmuster von Plasmiden, die veröffentlicht wurden (Portnoy et al., 1981; Heesemann et al., 1983; Laroche et al., 1984), belegen ebenfalls, daß die Plasmide der Serotypen O:3, O:8 und O:9 sehr spezifisch für die Stämme sind. Die enge Verwandtschaft der Plasmide untereinander wurde auch durch Hybridisierungsexperimente mit radioaktiv markierter DNA nachgewiesen (Portnoy et al., 1981;

Heesemann et al., 1983). Zwischen der Plasmid-DNA von Y. enterocolitica und Y. pestis existiert eine Homologie von 55 % (Portnoy et al., 1983).

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Virulenzeigenschaften von Yersinien und dem Auftreten extrachromosomaler DNA wurden erst 1980 von Zink et al. geliefert. Diese Autoren hatten eine Korrelation zwischen der Anwesenheit eines 67 Kb großen Plasmides und dem Invasionsvermögen bei Stämmen von Y. enterocolitica beobachtet. Zwar hatten Ogg et al. bereits 1958 die Annahme geäußert, daß die Mutationsrate in Richtung Avirulenz bei 37°C zu hoch für chromosomale Vorgänge sei und daher einem extrachromosomalen Kontrollmechanismus unterliegen müsse, doch gelang es Littel und Brubaker 1972 noch nicht, Plasmid-DNA aus virulenten vwa^+-Stämmen von Y. pestis zu isolieren.

Die eigentliche Bedeutung der zwischen 60 und 70 Kb großen Yersinia-Plasmide wurde erst offensichtlich, als Gemski et al. 1980 erkannten, daß neben der Invasivität und der Pathogenität für Mäuse die Determination der Calciumbedürftigkeit bei Y. enterocolitica von einem 63 Kb großen Plasmid ausgeht.
Die Calciumabhängigkeit stand bei Y. pestis und Y. pseudotuberculosis , wie bereits erwähnt, in enger Verbindung mit dem vwa-Virulenzfaktor. Die Autoren vermuteten daher, daß virulente Stämme von Y. enterocolitica den Phänotyp vwa^+ exprimierten, und schlugen aus diesem Grund vor, dem Plasmid die Bezeichnung Vwa-Plasmid zu geben. Wenig später wurde von Carter (1980) die Bildung von V- und W-Antigenen durch Y. enterocolitica bestätigt.
Bald darauf (Gemski et al., 1980) konnte auch aus Y. pseudotuberculosis ein Plasmid isoliert werden, welches in Größe und Funktion dem Plasmid von Y. enterocolitica ähnlich war (Produktion von V- und W-Antigenen, Calciumbedürftigkeit, Pathogenität im Tierversuch). Als dann Portnoy und Falkow (1981) auch bei Y. pestis in vwa^+-Stämmen ein Plasmid feststellten, das bei vwa^--Mutanten verloren gegangen war, wurde offensichtlich, daß der einzige gemeinsame Virulenzfaktor der virulenten Vertreter der Gattung Yersinia extrachromosomal determiniert wird.
Dies sowie weitreichende Gemeinsamkeiten der beteiligten Plasmide geben Spekulationen über deren Entstehung, Weiterentwicklung und Ausbreitung innerhalb der Gattung Yersinia Raum.
Das Verhalten dieser Plasmide in nicht pathogenen, oft in Lebensmitteln vertretenen (s. Hauröder, 1980) Angehörigen dieser Gattung zu untersuchen, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

Im Hinblick auf dieses Vorhaben interessierte es zunächst, ob Merkmale auf die-

sen Plasmiden lokalisiert sind, die als Selektionsmarker Verwendung finden könnten. Gedacht wurde an Antibiotikaresistenzen oder die Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenhydraten.

Y. enterocolitica-Stämme zeigten eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika. Eine Reihe von natürlichen Resistenzen, die teilweise chromosomal, teilweise extrachromosomal bedingt sind, wurde bekannt (Cornelis et al., 1973; Kimura et al., 1976). Darunter finden sich Resistenzen gegen Tetracyclin, Streptomycin, Kanamycin, Sulphonamide und, bedingt durch die Produktion verschiedener ß-Lactamasen, etliche ß-Lactamantibiotika (Cornelis et al., 1973; Cornelis und Abraham, 1975). Wie schon für andere Reaktionen war auch hinsichtlich der Antibiotikaresistenz von einigen Autoren eine Temperaturabhängigkeit festgestellt worden (Chester und Stotzky, 1976; Bottone und Robin, 1977). Obwohl 26 Antibiotika, gegen die zum Teil auch Resistenzen beschrieben worden waren, getestet wurden, konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Organismen die Kopplung einer Resistenz an das Vwa-Plasmid nicht nachgewiesen werden.

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Plasmid und der Befähigung, Kohlenhydrate verwerten zu können, ergaben sich bei 13 untersuchten Verbindungen ebenfalls nicht.

Im Zuge der weiteren Charakterisierung von plasmidtragenden und plasmidlosen Patienten- und Lebensmittelstämmen wurden die Virulenzeigenschaften dieser Stämme näher untersucht.

Wie bereits mehrfach erwähnt, spielt die Calciumbedürftigkeit hier eine bedeutende Rolle. Ein Screening mit Hilfe des von Higuchi und Smith (1961) für Y. pestis entwickelten calciumfreien Magnesium-Oxalat-Agars (MGOX-Agar) bestätigte den von Gemski und Lazere (1980) beobachteten Zusammenhang zwischen der Anwesenheit des Vwa-Plasmides und einer Calciumauxotrophie bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Stämme, die das Vwa-Plasmid trugen, konnten bei dieser Temperatur auf MGOX-Agar innerhalb von 24 Stunden nicht oder nur sehr verhalten wachsen. Vereinzelt auf den Platten aufgetretene große Kolonien waren Mutanten, die das Plasmid verloren hatten. Eine Weiterbebrütung der Platten bei 25°C führte dann zu einer normalen Entwicklung aller Kolonien.

Die Plasmide der Lebensmittelstämme bewirkten keine Veränderungen hinsichtlich des Wachstums der Stämme unter Calciummangelbedingungen. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Lebensmittelstämme vwa^- und somit avirulent sind.

Eine genauere Betrachtung der Wachstumsphysiologie anhand eines isogenen Paares (plasmidtragender Stamm und plasmidfreie Mutante) ließ erkennen, daß die Orga-

nismen, denen das Plasmid fehlt, auch unter Calciummangelbedingungen ein beständiges, von der Bebrütungstemperatur unabhängiges Wachstum führen können. Unter dem Einfluß des Vwa-Plasmides stellen die Zellen jedoch in Abwesenheit von Ca^{2+}-Ionen 2 bis 3 Generationen nach der Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C weitere Zellteilungen ein, sie treten in die statische Wachstumsphase ein. 19 Stunden später waren die virulenten Zellen bereits in der Absterbephase, während die avirulenten Mutanten sich weiter vermehrt hatten.
Wurde das Auftreten von vwa^--Mutanten innerhalb der Population der vwa^+-Organismen berücksichtigt, so wurde deutlich, daß die vwa^--Zellen die vwa^+-Zellen auf Grund ihres Wachstumsvorteils innerhalb von 19 Stunden weitgehend verdrängen. Ein Vergleich der Mutantenzahlen mit der Anzahl der Mutanten, die auf MGOX-Agar aufgetreten waren, ließ vermuten, daß die Mutationsrate in Richtung vwa^- in geschüttelten calciumfreien Flüssigkulturen wesentlich höher als auf festen Nährmedien liegt.
Der beschriebene Wachstumsversuch wurde mit einem Vertreter des Serotyps O:3 und seiner plasmidlosen Mutante durchgeführt. Dies scheint erwähnenswert, da der Verlauf der Wachstumskurve eher dem Verhalten von Y. pestis oder Y. pseudotuberculosis (Brubaker und Surgalla, 1964; Hall et al., 1974) als dem des von Carter et al. (1980) untersuchten Y. enterocolitica-Stammes entspricht. Dieser Stamm, der dem Serotyp O:8 angehörte, stellte im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit überprüften Stamm sein Wachstum nicht ein, sondern verlangsamte lediglich seine Wachstumsgeschwindigkeit. Angehörige von Y. pestis vollziehen dagegen nach dem Temperaturwechsel noch eine Zellteilung und treten dann sofort in die stationäre Phase ein. Hall et al. (1974) konnten auf Grund mikroskopischer Analysen nachweisen, daß die Zellen tatsächlich ihre Teilungsfähigkeit verloren und in die Länge wuchsen.
Die genaue Bedeutung der Calciumauxotrophie für den Virulenzmechanismus bei Yersinia ist noch nicht bekannt.
Gut dokumentiert ist das Bedürfnis nach Ca^{2+}-Ionen bei Eukaryonten (Barle, 1973). Ein Mangel kann hier zu folgenschweren Erkrankungen führen (Brauwald, 1982). In prokaryotischen Zellen kann Calcium als Kofaktor bei enzymatischen Reaktionen dienen (Pollak, 1962), und seine stabilisierende Rolle bei der "outer membrane" von gramnegativen Bakterien ist ebenfalls bekannt. Ein Mangel an Calcium kann zu morphologischen Veränderungen führen (Kojima et al., 1970; Snellen und Raj, 1970). Ein derartig grundsätzliches Bedürfnis für das Ion, wie es von virulenten Yersinien exprimiert wird, ist für Mikroorganismen recht ungewöhnlich, da Bakterien, oft unter Energieaufwand, Calcium aus der Zelle herauspumpen (Sil-

ver et al., 1975; Silver, 1977; Rosen und Brey, 1979).
Zahorchak et al. (1979) maßen die Nettosyntheseraten für Proteine, DNA und RNA und untersuchten die Energiebilanz unter restriktiven Wachstumsbedingungen bei Y. pestis-Stämmen. In Abwesenheit von Ca^{2+}-Ionen verzeichneten die Autoren im Verhältnis von Makromolekülen zur Zellmasse eine Zunahme bei DNA und Protein sowie eine Abnahme für RNA, gefolgt von einer Erniedrigung der Energiebilanz. Diese Veränderungen ähnelten stark den Vorgängen in Kontrollzellen bei deren Eintritt in die stationäre Wachstumsphase und mußten daher mehr als Folge denn als Ursache des Wachstumsstillstandes angesehen werden. Entsprechend verhielt es sich mit dem beobachteten Absinken der Energiebilanz, das hauptsächlich durch eine verminderte ATP-Konzentration hervorgerufen wurde. Die Autoren deuteten dies als Reaktion der Zellen auf die Reduzierung der RNA-abhängigen Transkription.
Die Beobachtung, daß exogenes ATP die Calciumabhängigkeit beseitigen konnte (Zahorchak et al., 1979; Zahorchak und Brubaker, 1982), führte zunächst zu der Annahme, daß Transport und die oxidative Phosphorylierung gestört und die Zellen auf extrazelluläre energiereiche Verbindungen angewiesen seien (Zahorchak et al., 1979). Diese Vermutung ließ sich nicht bestätigen, da dem Medium zugesetztes ATP von den Zellen weder aufgenommen noch gespalten wurde. Die Hauptwirkung des ATP war in diesem Fall vielmehr auf die Beseitigung von Mg^{2+}-Ionen aus dem Medium durch Bildung eines Chelatkomplexes zurückzuführen (Zahorchak und Brubaker, 1982). ATP konnte Calcium in der Unterdrückung der Produktion der V- und W-Antigene ersetzen (Zahorchak und Brubaker, 1982), für deren optimale Synthese ja Mg^{2+} (20 mM) benötigt wurde. Die eigentlichen Ursachen, die zum Verlust der Teilungsfähigkeit führen, sind weiterhin unbekannt.

Als die Virulenzantigene entdeckt worden waren, hatte man in ihnen zunächst eine Schutzfunktion gegen eine Phagocytose vermutet (Burrows und Bacon, 1956). Nachdem dann gezeigt worden war, daß vwa^{+}-Yersinien in Makrophagen überleben konnten (Cavanaugh und Randall, 1959; Jansen und Surgalla, 1969; Une und Zen-Yoji, 1979), wurde diesen Antigenen eine Beteiligung an der intrazellulären Überlebensfähigkeit zugesprochen (Jansen und Surgalla, 1964).
Die Virulenzantigene alleine können jedoch , zumindest in geringer Konzentration, nicht für die Ausprägung der Virulenz verantwortlich sein. Dies konnte an Hand von Mutanten belegt werden, die die V- und W-Antigene synthetisieren konnten, aber keine Calciumauxotrophie zeigten und auch nicht virulent waren (Brubaker und Surgalla, 1962; Brubaker und Surgalla, 1964). Diese Tatsachen lassen vermuten, daß der restriktive Zustand per se der auslösende Faktor für die Vi-

rulenz dieser Bakterien ist. Gestärkt wird diese These durch die Erkenntnis, daß die Produktion der V- und W-Antigene erst kurz nach dem Einstellen der Zellteilungen in vollem Umfang einsetzt (Zahorchak und Brubaker, 1982). Auch neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß zumindest ein Teil der Gene, die für die Calciumabhängigkeit kodieren, Virulenzgene sein müssen (Goguen et al., 1984).

Einen besonderen Aspekt gewinnen diese in vitro erhaltenen Befunde dadurch, daß die Bedingungen, unter denen die Wachstumshemmung sowie die Bildung der Antigene maximal hervortreten, hinsichtlich der Konzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} dem intrazellulären Milieu von Säugetierzellen entsprechen (Kretsinger, 1977; Brubaker, 1972). Allerdings wurde bisher weder die intrazelluläre Produktion der V- und W-Antigene noch deren Wechselwirkungen mit dem Stoffwechsel der Wirtszelle untersucht.
Brubaker (1979) und Wolf-Watz et al. (1985) haben vorgeschlagen, daß Yersinia-Zellen mit der Calciumabhängigkeit einen Mechanismus besitzen, der es ihnen erlaubt, zwischen intrazellulärem (niedrige Ca^{2+}-Konzentration) und extrazellulärem (hohe Ca^{2+}-Konzentration) Umfeld unterscheiden zu können.

Neben den Determinanten der temperaturbedingten Calciumauxotrophie und der Bildung der V- und W-Antigene konnten weitere Merkmale mit dem Vwa-Plasmid in Verbindung gebracht werden. So berichteten Laird und Cavanaugh (1980), daß virulente Stämme von Y. enterocolitica in Zellkulturmedium autoagglutinierten. Die Fähigkeit zur Autoagglutination war temperaturabhängig, d.h. sie trat bei 37°C, nicht aber bei 25°C auf. Für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme war teilweise ebenfalls eine solche Autoagglutination aufgefallen, jedoch konnte sie nicht nur in Zellkulturmedium, sondern auch in Vollmedium (LB, ohne Kohlenhydrate) beobachtet werden. Durch die Verwendung isogener Paare konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit zur Autoagglutination bei Stämmen der Serotypen O:3 und O:9 nur in Anwesenheit des Vwa-Plasmides auftrat. Befunde von Perry und Brubaker (1983) und Skurnik et al. (1984) bestätigten dies.
Es muß allerdings in Zweifel gezogen werden, daß die Fähigkeit zur Autoagglutination an sich einen Virulenzfaktor darstellt. So autoagglutinierten auch einige der untersuchten Lebensmittelstämme, unabhängig von einem Plasmid oder der Temperatur. Unterstützt wird diese Vermutung noch durch die Tatsache, daß virulente Y. pestis-Stämme unter keinen Umständen autoagglutinieren (Perry und Brubaker, 1983).
Ein Einfluß der Ca^{2+}-Ionenkonzentration auf das Autoagglutinationsvermögen konnte nicht festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, daß die Fähigkeit zur Auto-

agglutination zwar von Genen bestimmt wird, die bei Y. enterocolitica und Y. pseudotuberculosis auf dem Vwa-Plasmid lokalisiert sind, jedoch keine Verbindungen zur Expression des Phänotyps vwa^+ und zur Virulenz bestehen, sondern hierfür eher, wie von Brubaker (1967) vorausgesagt, hydrophobe Oberflächenbestandteile verantwortlich sind.
Neuere Untersuchungsergebnisse belegen, daß vornehmlich ein in der äußeren Zellmembran angesiedeltes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 000 an der Ausprägung der Autoagglutination beteiligt ist (Skurnik et al., 1984; Balligand et al., 1985).
Da die Überprüfung des Autoagglutinationsvermögens sehr schnell und einfach durchzuführen ist, kann der Test im Routineverfahren zusammen mit dem Auftreten des Koloniedimorphismusses als Hinweis auf die Anwesenheit des Vwa-Plasmides bei Y. enterocolitica-Stämmen der Serotypen O:3, O:8 und O:9 gewertet werden.

Eine Reihe von gramnegativen Bakterien werden durch geeignete Konzentrationen von menschlichem oder tierischem Serum abgetötet. Wird das Serum auf 56°C erhitzt, gehen diese Fähigkeiten verloren (Taylor und Kroll, 1983). Ausgelöst wird die Zerstörung der Bakterien durch das im Serum aktive Komplementsystem, wobei ein makromolekularer Proteinkomplex, der sogenannte Membranangriffskomplex (MAC), in die Zellmembran inseriert oder ihr aufgelagert wird (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1978). Die Bildung des MAC kann entweder auf dem klassischen oder dem alternativen Weg erfolgen. Die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade erfordert dabei eine Reaktion zwischen Antikörpern und bakteriellen Oberflächenantigenen, während der alternative Weg auch in Abwesenheit von Antigen-Antikörper-Interaktionen durch eine Änderung der Struktur oder Konformation von Zelloberflächenbestandteilen ausgelöst werden kann (Taylor, 1983).
Obwohl die genaue Bedeutung der Serumbakterizidie in vivo, vor allem wegen der Abgrenzung zu anderen spezifischen und nicht spezifischen Abwehrmechanismen der Wirtszellen, schwierig zu beurteilen ist, kommt ihr zweifellos eine Rolle im Abwehrsystem zu. Es wird angenommen, daß die bakterizide Wirkung des Serums sich aus der Notwendigkeit heraus entwickelt hat, invasive Mikroorganismen vom Infektionsort zu entfernen (Taylor, 1983). Da eine Resistenz gegenüber der Aktivität des Komplementsystems bei an Infektionen beteiligten Bakterienstämmen, vor allem, wenn eine Invasivität vorliegt, häufiger als bei nicht invasiven Organismen oder harmlosen Kommensalen anzutreffen ist, scheint eine enge Korrelation zwischen der Serumresistenz und der Virulenz bei gramnegativen Bakterien zu bestehen (Olling, 1977; Taylor, 1983).

Für Y. enterocolitica stellten Pai und deStephano (1982) erstmals eine Serumresistenz bei virulenten Zellen fest. Nicht virulente Zellen wurden dagegen in 10%igem Humanserum schnell abgetötet. Wie zuvor die Calciumabhängigkeit, das Autoagglutinationsvermögen und der Koloniedimorphismus wurde auch die Serumresistenz nur bei 37°C exprimiert. Dies ließ bereits eine Verbindung zu dem Vwa-Plasmid vermuten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Anwesenheit des Vwa-Plasmides den untersuchten Yersinia-Zellen Schutz vor einer Zerstörung durch das Komplementsystem verleiht. Ähnliche Befunde erhielten Heesemann et al. (1983) und Martinez (1983). Die Ursachen für das Auftreten einer Serumunempfindlichkeit bei bestimmten Bakterien sind offenbar vielschichtig und bisher nur unzureichend bekannt (Taylor, 1983). Martinez (1983) machte die Ausbildung von in der äußeren Zellmembran lokalisierten Proteinen (OMPs) für die Serumresistenz von Y. enterocolitica verantwortlich. Balligand et al. (1985) konnten zeigen, daß, wie schon im Falle der Autoagglutinationsfähigkeit, das Protein P1 zur Ausprägung dieses Merkmals benötigt wird, wenngleich P1 alleine keinen ausreichenden Schutz zu bieten vermochte.
Die Bedeutung der Serumresistenz für die Pathogenität der Gattung Yersinia ist unbestritten. Einzig für Y. enterocolitica ist die Bindung dieser Eigenschaft an das Vwa-Plasmid. Bei Y. pseudotuberculosis tritt die Resistenz gegenüber Serum zwar temperatur-, aber nicht plasmidabhängig auf, und bei Y. pestis ist die Serumresistenz weder temperatur- noch plasmidgebunden und somit konstitutiv (Perry und Brubaker, 1983; Une und Brubaker, 1984).

Die Notwendigkeit und Aussagefähigkeit von Tierversuchen im Hinblick auf Untersuchungen über Virulenzmechanismen von Organismen, die Infektionen bei Menschen hervorrufen, ist immer wieder diskutiert worden. Die Problematik bewegt sich zwischen zwei Extremen: dem Koch'schen Postulat, in dem die Reproduktion der menschlichen Erkrankung im Tierversuch gefordert wird, und dem Standpunkt, der Mensch ist keine Maus, wonach die Aussagefähigkeit von Tiermodellen in diesem Zusammenhang grundsätzlich fragwürdig ist.
Eine Reihe von Faktoren, die für die Ausprägung einer Virulenz verantwortlich sind, wie beispielsweise Invasivität und Toxinproduktion, können u.U. durchaus mit Hilfe von Zellkulturen, biochemischen oder immunologischen Methoden nachgewiesen werden. Schwierigkeiten treten dagegen auf, wenn komplexere Vorgänge, wie die Fähigkeit zur Kolonisation, beurteilt werden müssen (Freter und Jones, 1983).
Für Y. enterocolitica sind mehrere Tiermodelle entwickelt worden, die Meerschweinchen (Gemski et al., 1980), Kaninchen (Une, 1977; Pai et al., 1980) und

Mäuse (Carter, 1975; Niléhn, 1973; Gemski et al., 1980; Laird und Cavanaugh, 1980) einschließen. Gut bewährt hat sich inzwischen das Maus-Diarrhöe-Modell von Laird und Cavanaugh (1980). Nach den Erfahrungen, die mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämmen gemacht wurden, eignet sich dieses Modell auch zum Nachweis milder Diarrhöen und der Kolonisationsfähigkeit. Dies ist ein besonderer Vorteil bei der Arbeit mit Stämmen der Serotypen O:3 und O:9, da diese Organismen im Gegensatz zu Vertretern des Serotyps O:8 nicht lethal für die Tiere sind. Eine Erhöhung der Lethalität dieser Serotypen mit Hilfe von Eisendextran, wie von Lee et al. (1981) und Smith et al. (1981) vorgeschlagen, erschien unter diesen Umständen nicht notwendig.

Weshalb die Stämme des Serotyps O:8 lethal für Mäuse sind, während die Serotypen O:3 und O:9 relativ milde Symptome hervorrufen, konnte bisher nicht geklärt werden. Heesemann et al. (1983) hatten vorgeschlagen, daß ein etwa 8,4 Kb großes Bam HI-Fragment für die Mauslethalität verantwortlich sein könnte, da dieses Fragment keine Homologie zum Vwa-Plasmid des Serotyps O:8 zeigte. Diese Vermutung ließ sich jedoch nicht bestätigen. Kay et al. (1980) veröffentlichten die Isolierung eines 132 Kb großen Plasmides und sprachen ihm eine wichtige Funktion bei den fatalen Infektionen der Maus zu. Ob dem Plasmid tatsächlich diese Bedeutung zu kommt, wird neuerdings in Zweifel gezogen (Gemski, pers. Mitteilung). Möglicherweise ist die Immunabwehr gegen den Serotyp O:8 schwächer als bei den übrigen Serotypen. So konnten selbst avirulente Stämme dieses Serotyps in Mäuseserum überleben, obwohl sie in Humanserum sofort abgetötet wurden (Une und Brubaker, 1984).

Eindeutig konnte dagegen in den vorliegenden Versuchen mit isogenen Paaren die Rolle des Vwa-Plasmides für die Kolonisierungsfähigkeit dargestellt werden. Plasmidfreie Stämme wurden sehr schnell aus dem Tier entfernt und waren 3 Tage nach ihrer Aufnahme nicht mehr im Kot der Tiere nachweisbar. Plasmidtragende Organismen konnten demgegenüber offenbar im Tier kolonisieren und wurden noch bis zu 12 Tagen nach ihrer Aufnahme ausgeschieden. Die Existenzfähigkeit der Bakterien im Darm wird demnach durch das Plasmid gesichert. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß die Maus sich gut als biologisches Filter zur Selektionierung plasmidführender Stämme aus Mischpopulationen eignet (Ergebnisse nicht dargestellt). Ähnliche Befunde erhielten auch Hammerschmidt und Hellmann (1984).

In welcher Weise die Bakterien sich in der Mucosa des Darmepithels etablieren, und welche Determinaten des Plasmides hierfür die wesentlichen Voraussetzungen liefern, muß noch geklärt werden. Da Y. enterocolitica bei höheren Temperaturen

(37°C) nicht mehr beweglich ist, erscheint ein aktives Eindringen der Bakterien in die Mucosa zweifelhaft.

Heesemann et al. (1984) hatten bei plasmidtragenden Stämmen eine vermehrte Extrusion von Proteinen ins Kulturmedium beobachtet und mutmaßten, daß es sich hier um Proteine aus der "outer membrane" handeln könne. Im Gegensatz dazu konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme eine verstärkte Freisetzung von Proteinen unter Calciummangelbedingungen nicht festgestellt werden.
Bisher ist bekannt, daß die Bildung der V- und W-Antigene durch die Temperatur und die Calciumionenkonzentration beeinflußt wird (Brubaker und Surgalla, 1964). Das V-Antigen ist jedoch ein lösliches Protein und intrazellulär angesiedelt (Straley und Brubaker, 1981). Das W-Antigen ließ sich wegen seiner geringen Antigenität bisher nicht genau lokalisieren (Straley und Brubaker, 1981).
Bölin et al. (1982) vermuteten zwar, daß das W-Antigen mit dem von ihnen in der "outer membrane" gefundenen Protein 1 (P1) identisch sei, die Bildung von P1 wurde aber durch die Ca^{2+}-Ionenkonzentration nur unwesentlich (Bölin et al., 1982) bzw. nicht (Bölin und Wolf-Watz, 1984) beeinflußt. Auch andere Proteine traten unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Calcium in der "outer membrane" auf (Bölin et al., 1982; Chang und Doyle, 1984). Diese Befunde, die durch die Analysen von Membranfraktionen gewonnen wurden, scheinen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

Nach den bisher durch die Untersuchung isogener Paare gewonnenen Erkenntnissen können folgende Merkmale als durch das Vwa-Plasmid bedingt angesehen werden: Koloniedimorphismus, Calciumabhängigkeit, Autoagglutinationsvermögen, Resistenz gegenüber Humanserum und Kolonisationsfähigkeit in der Maus. Gemeinsam ist diesen Merkmalen die temperaturabhängige Expression. Möglicherweise können die entscheidenden Gene des Vwa-Plasmides in Abhängigkeit von der Temperatur an- oder abgeschaltet werden.

Außerdem konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, daß die hier bearbeiteten Lebensmittelstämme keine Vwa-Plasmide enthielten, ihr Phänotyp demnach vwa^- war.

In den im folgenden diskutierten Versuchen sollte überprüft werden, ob das Vwa-Plasmid auf vwa^--Lebensmittelstämme übertragen werden konnte, und ob die oben erwähnten Eigenschaften in diesen Stämmen exprimiert würden.
Hierzu mußte zunächst ein geeignetes Selektionsverfahren entwickelt werden. Wie bereits gezeigt wurde, konnten weder Gene zur Verwertung von Kohlenhydraten, noch zur Vermittlung von Antibiotikaresistenzen auf den Vwa-Plasmid lokalisiert wer-

den. Ein Selektionsmarker war somit nicht vorhanden und auch in der Literatur nicht beschrieben worden.

Die Versuche, auf der Grundlage der Calciumauxotrophie mit Hilfe von einer Antibiotikaanreicherung eine Selektionierung von vwa^+-Organismen zu erzielen, verliefen wenig erfolgreich. Die Gründe sind zum einen in der relativ hohen Resistenz der Bakterien gegen Ampicillin, Bacitracin und Cycloserin zu suchen, zum anderen in der Ausprägung der Calciumauxotrophie selbst. Von einem wirksamen ß-Lactamantibiotikum wurden vwa^+- wie vwa^--Zellen gleichermaßen abgetötet. Möglicherweise war der unter Calciummangel auftretende Wachstumsstillstand nicht ausgeprägt genug, um einen wirksamen Schutz zu leisten. Wahrscheinlicher ist aber, daß ein verstärktes Auftreten von vwa^--Mutanten die Isolierung von vwa^+-Zellen verhinderte.

Da die Antibiotikaanreicherung zur Selektion nicht eingesetzt werden konnte, mußte nach einem Weg gesucht werden, einen selektionsfähigen Marker auf dem Vwa-Plasmid selbst zu etablieren, ohne wesentliche Gene zur Ausprägung von Virulenzeigenschaften und für die Reproduktion des Plasmides zu beeinträchtigen. Hier schien der Einsatz von Transposon geeignet. Vorteilhaft war dabei, daß die Manipulation in vivo vorgenommen werden konnte.

Das Transposon Tn 921 trägt Gene zur Verwertung von Lactose und wurde erstmals von Cornelis et al. (1978) isoliert und beschrieben. Der natürliche "Wirt" dieses Transposons ist pGC1 (Cornelis et al. 1976), ein etwa 50 Kb großes konjugatives Plasmid aus Y. enterocolitica. Da Y. enterocolitica-Stämme über ein sehr effektives Restriktions-Modifikations-System verfügen (Cornelis und Colson, 1975), wodurch artfremde DNA beim Eintritt in die Zelle zerstört wird, wenn sie nicht die richtigen Modifikationen besitzt, versprach die Verwendung eines Yersinia-Plasmides weniger Schwierigkeiten.
Die Gründe für das Mißlingen des Versuches, auf diese Weise das lac-Operon von Tn 921 auf das Vwa-Plasmid zu übertragen, lagen auch nicht am Überträger pGC1, sondern an dem Transposon. Es stellte sich heraus, daß die Eigenschaft der Lactoseverwertung nicht stabil war. Eine Erklärung für dieses, in geringem Ausmaß auch schon von Cornelis (1976) beobachteten Phänomen, lieferten Cornelis et al. (1981). Das Transposon war defekt und enthielt ein Insertionselement im lac-Operon.

Als Vehikel für die Transposons Tn 10 (Tetracyclin) und Tn 5 (Kanamycin) wurde $F'_{ts}lac$ gewählt, ein konjugatives Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe FI. Das Plasmid besitzt ein Lactose-Operon und wird durch eine Mutation in den Replika-

tionsgenen oberhalb einer Temperatur von 42°C nicht mehr repliziert (Gemski, pers. Mitteilung). Hierdurch erleichterte sich eine später notwendige Eliminierung.
Die durchgeführten Versuche führten zwar nicht zur angestrebten Markierung des Vwa-Plasmides, lieferten jedoch andere interessante Hinweise. Das Vwa-Plasmid konnte nicht zusammen mit dem FI-Plasmid in einer Zelle gehalten werden, d.h. die beiden Plasmide waren offenbar nicht kompatibel. Demnach mußte das Vwa-Plasmid zur Inkompatibilitätsgruppe F gehören.
Diese Vermutung wurde wenig später von Bakour et al. (1983) u.a. mit Hilfe des gleichen Plasmides (F'_{ts}lac::Tn 10) bestätigt.
Die Verteilung von nicht kompatiblen Plasmiden auf die Tochterzellen erfolgt in der Regel zufällig (Novick, 1981). Im vorliegenden Fall des Stammes MCH 628 (Serotyp O:3) wurde aber ganz klar das Vwa-Plasmid von dem F'lac-Plasmid unterdrückt, eine Beobachtung, die auch Barkour et al. (1983) speziell für die Plasmide des Serotyps O:3 machten. Interessanterweise waren die Verhältnisse beim Serotyp O:9 umgekehrt: Das Vwa-Plasmid verdrängte das F'lac-Plasmid.
Die Autoren zeigten weiterhin, daß die Inkompatibilität des Vwa-Plasmides von der Inkompatibilitätssequenz incD vermittelt wird. Das Vwa-Plasmid ist aber offensichtlich anders als das F'lac-Plasmid organisiert. So ist die Homologie zwischen beiden Plasmiden auf die incD-Region beschränkt, und das Vwa-Plasmid besitzt auch ein von incD verschiedenes Replikon (Bakour et al., 1983).
Es existieren Hinweise, daß auch die Vwa-Plasmide von Y. pseudotuberculosis und Y. pestis der Inkompatibilitätsgruppe FI angehören (Bakour et al., 1983; Zsigray, 1983).

Gut untersuchte und bei der Arbeit mit E. coli häufig benutzte Vektoren wie pBR 322 oder pAYC 184 konnten wegen ihres engen Wirtsspektrums bei Y. enterocolitica nicht eingesetzt werden. Als geeigneter Vektor für diese Species hat sich nach den Befunden dieser Arbeit das Plasmid RP1 erwiesen. Das Plasmid trägt Resistenzgene für Ampicillin/Carbenicillin, Kanamycin und Tetracyclin (Grinsted et al., 1972). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid $RP1_{ts}$ war wiederum temperaturempfindlich. Oberhalb einer Inkubationstemperatur von 30°C erfolgte keine Replikation mehr (Kopecko, pers. Mitteilung). Auf Grund der von $RP1_{ts}$ vermittelten Resistenzen konnten die Transposons Tn 10 und Tn 5 nicht mehr verwendet werden. Es war jedoch bekannt, daß beispielsweise Tn 7 (Streptomycin und Sulphonamide) und Tn 501 (Quecksilber) mit hoher Frequenz auf RP1 transponieren können (Barth et al., 1976; Barth und Grinter, 1977; Bennett et al., 1978; Grinsted et al., 1978).

Mit Hilfe von Stämmen, die Tn 7 und Tn 501 im Chromosom trugen, gelang es, zwei Plasmide herzustellen ($RP1_{ts}$::Tn7 und $RP1_{ts}$::Tn501), mit denen nun erneut der Versuch unternommen werden konnte, das Vwa-Plasmid zu markieren. Beide Plasmide ließen sich mitsamt den entsprechenden Transposons gut in Y. enterocolitica einkonjugieren. Es gelang jedoch nicht die beiden Transposons Tn 7 und Tn 501 auf dem Vwa-Plasmid zu etablieren. Hierzu ist zu bemerken, daß Tn 501, zumindest bei der Transposition auf RP1, eine verstärkte Tendenz gezeigt hatte, in ganz bestimmte Sequenzen, sogenannte "hot spots", zu inserieren (Grinsted et al., 1978). Die Möglichkeit, im Chromosom die für die Transposition bevorzugte DNA-Sequenz anzutreffen, ist natürlich weitaus größer als bei einem Plasmid. Für die Vermutung, daß das Transposon ins Chromosom gesprungen war, spricht auch das Auftreten von Klonen, die die von Tn 501 vermittelte Quecksilberresistenz auch in Abwesenheit jeglicher Plasmid-DNA exprimierten. Ein weiterer Punkt , der bei derart ortsspezifischen Vorgängen berücksichtigt werden muß, ist, daß die Insertion eines Transposons in eine Region, die für die Replikation des Plasmides erforderlich ist, nicht entdeckt werden kann.
Auch für Tn 7 konnte eine stabile Transposition auf das Vwa-Plasmid nicht festgestellt werden. Es sind hier ähnliche Gründe wie bei Tn 501 zu vermuten (vgl. Barth et al., 1976; Lichtenstein und Brenner, 1981 und 1982). Obwohl die beobachtete Größenzunahme von Vwa eine Insertion hatte erwarten lassen, deuteten die weiteren Ergebnisse darauf hin, daß Tn 7 ebenfalls ins Chromosom inseriert hatte.

Wie eine genauere Untersuchung des vergrößerten Vwa-Plasmides ergab, rührte das zusätzliche DNA-Stück tatsächlich von einer Insertion her, allerdings war nicht Tn 7 sondern Tn 1 transponiert. Tn 1 ist verantwortlich für die Ampicillin-/Carbenicillinresistenz von RP1 (Hedges und Jacob, 1974).
Ein Vergleich der Schnittmuster von Vwa::Tn1 und dem ursprünglichen Vwa-Plasmid bestätigte dieses Ergebnis und zeigte, wo das Transposon inseriert hatte.
Wie eine Überprüfung des Stammes $718V^{+}$, der das markierte Plasmid trug, ergab, hatte die Insertion keins der bekannten Virulenzgene beeinträchtigt. Koloniedimorphismus, Calciumabhängigkeit, Autoagglutination, Serumresistenz und Kolonisationsvermögen wurden in diesem Stamm genauso wie in einem mitgetesteten Kontrollstamm ausgeprägt.

Nachdem es gelungen war, mit Tn 1 eine selektionsfähige Markierung auf dem Vwa-Plasmid zu etablieren, bot sich die Möglichkeit, die Transfereigenschaften des Plasmides zu untersuchen. Der Einfachheit halber wurde als Rezipient E. coli

HB 101, ein Stamm, der keine wirtsspezifischen Restriktions- und Modifikationssysteme ausbildet und ein sehr weites Wirtsspektrum besitzt (Maniatis et al., 1982), verwendet. Auf dem Wege der Konjugation konnte keine Übertragung des Vwa-Plasmides auf E. coli HB 101 nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, daß das Vwa-Plasmid nicht konjugativ ist. Die Tatsache, daß bisher über keine erfolgreiche Konjugation des Vwa-Plasmides berichtet worden ist, unterstützt diesen Befund indirekt.
Die zweite Möglichkeit, wonach das Plasmid zwar übertragen, in dem E. coli-Stamm aber nicht repliziert oder exprimiert wird, erschien wegen des weiten Wirtsspektrums von HB 101 unwahrscheinlich und konnte auch in weiteren Versuchen widerlegt werden.
Das Plasmid ließ sich nicht mit Hilfe von $RP1_{ts}$ mobilisieren, auch nicht über eine Tn 1 vermittelte Cointegratbildung. Es ist zwar wahrscheinlich, daß über Tn 1 Cointegrate zwischen $RP1_{ts}$::Tn1 und Vwa::Tn1 hergestellt wurden, jedoch lag die Transferfrequenz für dieses Hybridplasmid möglicherweise so weit unter der Konjugationsfrequenz von $RP1_{ts}$, daß Klone, die daß Cointegrat oder beide Plasmide enthielten, nicht entdeckt werden konnten.
Mit Hilfe der Transformation gelang es schließlich, das Vwa-Plasmid in E. coli HB 101 zu etablieren, wobei sich Tn 1 als Selektionsmarker bewährt hat.

Hinsichtlich der Ausprägung von Yersinia-eigenen Genen in E. coli gibt es widersprüchliche Befunde. Während Heesemann und Laufs (1983) und Balligand et al. (1985) keine Expression der von ihnen übertragenen Gene in E. coli erhielten, berichteten Bölin und Wolf-Watz (1984) sowie Isberg und Falkow (1985) von positiven Versuchen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Serumresistenz eindeutig nicht in dem E. coli-Stamm ausgeprägt. Weniger deutlich fielen die Ergebnisse für die Calciumabhängigkeit und die Autoagglutinationsfähigkeit aus, wobei die Calciumauxotrophie als eher positiv (d.h. ausgeprägt) und das Autoagglutinationvermögen als eher negativ (d.h. nicht ausgeprägt) gewertet wurde. Die Ausbildung des Koloniedimorphismusses war dagegen bei dem E. coli-Transformanten ähnlich gut wie bei Y. enterocolitica zu beobachten.
Falls es zutrifft, daß das plasmiddeterminierte Protein P1 an der Ausbildung der Fähigkeit zur Autoagglutination und der Serumresistenz bei Y. enterocolitica beteiligt ist (Balligand et al., 1985), sprechen die erhaltenen Ergebnisse gegen eine Expression dieses Proteins in E. coli. Dieser Befund steht im Einklang mit den von diesen Autoren gemachten Beobachtungen und widerspricht den von Bölin et al. (1985) gewonnenen Erkenntnissen.

Wegen der relativ hohen natürlichen Resistenzen von Y. enterocolitica gegenüber ß-Lactamantibiotika war Tn 1 zunächst keine bedeutende Rolle für die Markierung des Vwa-Plasmides zugemessen worden. Eine genauere Überprüfung der Ampicillinresistenz ergab aber eine deutliche Zunahme der Sensitivität von Y. enterocolitica bei einer Anhebung der Inkubationstemperatur von 25°C auf 37°C. Tn 1 kann in diesem Temperaturbereich demnach auch bei Transferversuchen, bei denen ein Y. enterocolitica-Stamm als Rezipient auftritt, als Selektionsmerkmal eingesetzt werden.

Zur Übertragung des Vwa-Plasmides auf einen Lebensmittelstamm von Y. enterocolitica war die Entwicklung eines Transformationssystems erforderlich. Erfolgreiche Transformationen waren bereits mit Y. pestis durchgeführt worden (Portnoy et al., 1983; Goguen et al., 1984), die Transformierbarkeit von Y. enterocolitica bereitete dagegen offenbar Schwierigkeiten (Heesemann und Laufs, 1983; Laroche et al., 1984).
Erst vor kurzem gelang Balligand et al. (1985) die Transformation einer restriktionsnegativen Mutante von Y. enterocolitica. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode wurde an Hand von RSF 1010, einem 8,9 Kb großen, nicht konjugativen Plasmid, entwickelt. Das Plasmid trägt Resistenzgene gegen Streptomycin und Sulphonamide und zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus (Barth und Grinter, 1974; Nagahari und Sakaguchi, 1978; David et al., 1981; Bagdasarian et al., 1981).

Die Übertragung von RSF 1010 auf den Lebensmittelstamm B85AN zeigte zum einen, daß auch Wildtypstämme von Y. enterocolitica transformierbar sind, zum anderen bedeutet die erfolgreiche Propagierung von RSF 1010 in Y. enterocolitica, daß die hervorragenden Vektoreigenschaften von RSF 1010 (Bagdasarian et al., 1981) für diese Species nutzbar gemacht werden können. Die hohe Mobilisierbarkeit von RSF 1010 durch RP1 (Willets, 1984) erlaubt darüber hinaus den Aufbau eines Klonierungssystems, mit dessen Hilfe Klonierungen auch in schlecht transformierbaren Organismen durchgeführt werden können.
Die in dieser Arbeit beschriebene Transformationsmethode eignet sich nicht nur zur Übertragung kleiner Vektoren, auch das für eine Transformation ungünstig große Plasmid pMB 718 (Vwa::Tn1) konnte auf diese Weise in dem Stamm B85AN etabliert werden.
Ein Vergleich der Schnittmuster von Plasmid-DNA aus Transformantenzellen mit dem Plasmid des Donorstammes bewies ganz klar, daß der Rezipient B85AN das markierte Vwa-Plasmid pMB aufgenommen hatte. Für die Transformanten wurde die Be-

zeichnung B85ANV$^+$ eingeführt. Die Bestimmung der Transformationsfrequenz war, bedingt durch einen relativ hohen Hintergrund, der trotz der verstärkten Empfindlichkeit des Rezipienten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C auftrat, nicht möglich. Abhilfe könnte hier geschaffen werden durch: 1. die Anwendung von ß-Lactamantibiotika, die von den in Y. enterocolitica auftretenden ß-Lactamasen nicht angegriffen, jedoch von dem durch Tn 1 vermittelten Enzym gespalten werden können; 2. den Einsatz von hoch Ampicillin-empfindlichen Mutanten von Y. enterocolitica.

Die Überprüfung von B85ANV$^+$ auf die Ausprägung der mit dem Vwa-Plasmid assoziierten Merkmalen, ergab für alle auch beim Donorstamm 718V$^+$ festgestellten Eigenschaften eine Expression. Es traten jedoch graduelle Unterschiede auf.
Das Phänomen des Koloniedimorphismusses, welches in dem Rezipientenstamm B85AN nie beobachtet worden war, wurde von dem Transformanten sehr deutlich ausgebildet. Die Größenunterschiede zwischen plasmidführenden und plasmidfreien Zellen traten hier noch krasser hervor als bei dem Donorstamm. Die Kolonieoberfläche der transformierten Organismen war glatt, während der ursprüngliche Rezipient eine rauhe Oberfläche besaß. Dies deutete auf eine tiefgreifende Veränderung in der Zelloberfläche, hervorgerufen durch auf dem Vwa-Plasmid lokalisierte Gene, hin. Ob für diesen Wechsel in der Koloniemorphologie die verschiedenen im Zusammenhang mit dem Plasmid aufgetretenen Proteine in der äußeren Zellmembran (Portnoy et al., 1981; Bölin et al., 1982; Chang et al., 1984) verantwortlich gemacht werden können, ist möglich, bedarf aber noch der Klärung.

Die Bedürftigkeit nach Ca^{2+}-Ionen für ein Wachstum bei 37°C unterschied den transformierten Lebensmittelstamm von seinem Elternstamm und von allen übrigen Lebensmittelstämmen. Die Ausprägung dieses Merkmals entsprach der in traditionell virulenten Stämmen von Y. enterocolitica. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Rückmutationsrate für die Transformanten bei etwa 50 % lag und damit die Mutationsrate zum Phänotyp vwa$^-$ bei virulenten Stämmen der Serotypen O:3 und O:9 übertraf.

Sämtliche Transformantenzellen, die das Plasmid pMB 718 trugen, waren auch autoagglutinationsfähig, allerdings besaßen einige plasmidlose Stämme diese Fähigkeit auch. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden, jedoch war ein solches Verhalten auch schon bei anderen Lebensmittelstämmen beobachtet worden. Modifikationen im Gehalt an hydrophoben Bestandteilen der "outer membrane" mögen hierbei eine Rolle spielen (Brubaker, 1983). Die Ergebnisse zeigten, daß das Merkmal Autoagglutination zwar ausgeprägt wurde, bei diesen Stämmen aber

keinen zuverlässigen Hinweis auf die Präsenz eines Vwa-Plasmides gibt.

Bei der Festellung der Serumresistenz überlebten die Transformantenzellen im Gegensatz zu den nicht transformierten Zellen des Rezipienten (B85AN) und den beiden mitgetesteten avirulenten Mutanten während einer Versuchsdauer von zwei Stunden. Die Zellzahl war nach dieser Zeit allerdings auf etwa 1 % der Ausgangskonzentration zurückgegangen. Nach einer Forderung von Taylor (1983) sind nur solche Stämme als serumresistent zu bezeichnen, die vollkommen widerstandsfähig sind, wenn sie in der frühlogarithmischen Wachstumsphase gegen einen Überschuß an Komplement getestet werden. Nach dieser Definition sind die Transformanten nicht resistent gegen Humanserum. Es ist jedoch fraglich, ob nach dieser engen Auslegung eine Vielzahl von virulenten Yersinia-Stämmen als serumresistent bezeichnet werden können.
Ungeachtet dessen ist zumindest die deutliche Verringerung der Serumempfindlichkeit des Transformanten gegenüber den plasmidlosen Kontrollstämmen und dem ursprünglichen Rezipienten hervorzuheben. Die Bedeutung einer solchen verminderten Empfindlichkeit, bei der Bakterien erst nach einer längeren Einwirkung des Serums merklich reduziert werden, ist nicht einfach zu beurteilen. So wäre es durchaus vorstellbar, daß bei intrazellulären Parasiten wie Y. enterocolitica (Brubaker, 1983) die normale Verweildauer im Serum des Wirtes relativ kurz ist, da die Organismen schnell von einer Makrophagenzelle aufgenommen werden. In diesem Fall würde eine kurzfristige Umgehung des Komplementsystems u.U. völlig ausreichen. Ist es dem Bakterium erst gelungen, in das Zellinnere des Makrophagen einzudringen, kann es von dem Komplementsystem nicht mehr erreicht werden.

Der Tierversuch wird mittlerweile als das aussagekräftigste Mittel angesehen, Hinweise auf das Virulenzpotential von Yersinia-Stämmen zu liefern (Kay et al., 1983; Hammerschmidt und Hellamm, 1984; Gemski, pers. Mitteilung).
Da die in Europa vorherrschenden Serotypen O:3 und O:9 keine Lethalität gegenüber Mäusen aufweisen, müssen Merkmale wie die Ausbildung von Diarrhöen und die Kolonisationsfähigkeit besonders sorgfältig untersucht werden (Riccardi et al., 1978; Maruyama et al., 1979).
Der transformierte Lebensmittelstamm konnte noch 12 Tage nach seiner Aufnahme im Kot der Versuchstiere nachgewiesen werden. Damit war der Stamm eindeutig kolonisierungsfähig. Auch andere Symptome wie eine milde, vorübergehende Diarrhöe und die typische "Verstopfung", hervorgerufen durch eine verstärkte Flüssigkeitseinlagerung in das Faecesmaterial, konnten festgestellt werden.
Die Rückisolation von plasmidtragenden Zellen aus den Tieren zeigte, daß das Plasmid pMB 718 durchaus stabil in dem Stamm gehalten werden konnte .

Ob die transformierten Lebensmittelzellen durch den Erwerb von pMB 718 tatsächlich in die Lage versetzt wurden, eine Darminfektion beim Menschen hervorrufen zu können, oder ob weitere Determinanten hierfür erforderlich sind, konnte auf diesem Weg natürlich nicht geklärt werden. Die Möglichkeit, daß bisher als avirulent geltende Lebensmittelstämme der Species Y. enterocolitica und Vertreter der nicht pathogenen Arten Y. intermedia, Y. kristensenii und Y. frederiksenii bei dem Erwerb des Vwa-Plasmides, dem hier zweifellos eine Schlüsselposition zukommt, virulent werden, muß in Betracht gezogen werden.
Nach dem bisherigen Kenntnisstand wäre die Aussage, alle Vertreter der Species Y. enterocolitica seien virulent genausowenig vertretbar, wie die Einstufung der Species Y. intermedia, Y. frederiksenii und Y. kristensenii als apathogen (vgl. Kay et al., 1983).
Für Routineuntersuchungen, bei denen oft eine schnelle Unterscheidung zwischen virulenten und avirulenten Stämmen erforderlich ist, kann die exponierte Bedeutung des Vwa-Plasmides nutzbar gemacht werden. Eine schnelle und relativ einfach durchzuführende Methode ist beispielsweise die von Hill et al. (1983) vorgeschlagene Koloniehybridisierung. Als Probe böten sich in diesem Fall 3 Bam HI-Fragmente mit Größen von 4,0 Kb, 4,7 Kb und 5,8 Kb an, die bei allen bisher untersuchten Vwa-Plasmiden von Y. enterocolitica vorhanden waren und nach Befunden von Balligand et al. (1985) die Region für die Calciumabhängigkeit repräsentieren.

Auch wenn die im Verlauf der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß es potentiell möglich ist, das Vwa-Plasmid auf nicht virulente Stämme zu übertragen und dadurch eine Ausprägung von Virulenzeigenschaften in diesen Stämmen zu erhalten, sprechen die großen Schwierigkeiten, die vor der Etablierung des Vwa-Plasmides in einem Lebensmittelstamm überwunden werden mußten, zusammen mit der Erkenntnis, daß das Plasmid mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht konjugativ ist, gegen einen generellen Austausch von Virulenzgenen in vivo.

Es wäre im weiteren jedoch sicherlich interessant zu verfolgen, ob die nicht zu den traditionell pathogenen Yersinien zählenden Stämme sich zum jetzigen Zeitpunkt, wie Bottone (1978) vermutet hat, u.U. in einem Stadium befinden, in dem sie sich an den Menschen als Wirt anpassen, und ob diese Organismen in Zukunft in der Tat eine klinische Relevanz erhalten. Nach den bisherigen Erfahrungen mit Y. pestis und Y. pseudotuberculosis käme der Entwicklung eines analogen Vwa-Plasmides für diese Stämme eine besondere Bedeutung zu.
Untersuchungen, die sich mit der Evolution der bisher bekannten Vwa-Plasmide beschäftigen, könnten hier richtungsweisende Beiträge liefern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. 26 aus Patienten isolierte Stämme der Serotypen O:3 und O:9 sowie 8 Lebensmittelstämme wurden auf das Vorkommen extrachromosomaler DNA hin untersucht und mit Stämmen, die in den USA und in Kanada isoliert worden waren, verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Patientenstämme, sofern extrachromosomale DNA bei ihnen nachgewiesen werden konnte, ein Plasmid von recht einheitlicher Größe besaßen, während das Plasmidmuster der Lebensmittelstämme heterogener war.

2. Die Größe der Plasmide war charakteristisch für den jeweiligen Serotyp. Insgesamt unterschieden sich die Plasmide der Serotypen O:8 (63 Kb), O:9 (66 Kb) und O:3 (69 Kb) nur um je 3 Kb.

3. Plasmide aus Patientenstämmen wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Bam HI, Eco RI und Hind III einer vergleichenden Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei wurden große Ähnlichkeiten zwischen den Plasmiden der einzelnen Serotypen, besonders zwischen dem Plasmid des Serotyps O:3 und dem Plasmid des Serotyps O:9, deutlich.
Die Größen der bei der Verdauung entstandenen Fragmente wurden auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität bestimmt.

4. Durch vergleichende Untersuchungen isogener Paare konnte gezeigt werden, daß die 63-69 Kb großen Plasmide an der Ausprägung folgender Eigenschaften beteiligt sind: Koloniedimorphismus, Autoagglutination, Calciumbedürftigkeit, Serumresistenz und Kolonisationsvermögen. Die Mehrzahl dieser Eigenschaften ist temperaturabhängig und tritt bei 37°C, nicht aber bei 25°C auf. Plasmidlose Mutanten oder Lebensmittelstämme zeigten diese Merkmale nicht.
Hinweise auf eine verstärkte, durch Calciummangel ausgelöste Extrusion von Proteinen ins Kulturmedium wurden nicht gefunden.

5. Selektionsfähige Merkmale wie Antibiotikaresistenzen oder die Fähigkeit, bestimmte Kohlenhydrate verwerten zu können, wurden nicht auf dem Plasmid lokalisiert.

6. Der Einsatz einer Antibiotikaanreicherung auf der Grundlage der Calciumauxotrophie erwies sich für die Selektionierung von plasmidtragenden Zellen als ungeeignet.

7. Die Unverträglichkeit zwischen dem Vwa-Plasmid und dem Plasmid F'lac_{ts} deutete darauf hin, daß das Vwa-Plasmid zur Inkompatibilitätsgruppe F gehörte.

8. Die Transferversuche zeigten, daß das Resistenzplasmid RP1 gute Vektoreigenschaften für Y. enterocolitica besitzt. Das Plasmid ließ sich gut in die Yersinia-Stämme einkonjugieren und wurde stabil in den Zellen gehalten.

9. Mit Hilfe von Tn 1 gelang es, eine Resistenz gegen Ampicillin als Markierung auf dem Vwa-Plasmid zu etablieren. Versuche, eine Transposition von Tn 7 oder Tn 501 auf dieses Plasmid zu erzwingen, waren nicht erfolgreich.

10. Das markierte Vwa-Plasmid pMB 718 konnte weder auf E. coli HB 101 noch auf Y. enterocolitica durch Konjugation übertragen werden. Daraus mußte geschlossen werden, daß das Plasmid nicht konjugativ ist.

11. Versuche, pMB 718 zusammen mit RP1 zu übertragen, wiesen darauf hin, daß das markierte Vwa-Plasmid, zumindest durch RP1, nicht mobilisiert werden kann.

12. An Hand des nicht konjugativen Plasmides RSF 1010 gelang es, ein Transformationsverfahren für Y. enterocolitica zu entwickeln.
Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte das Vwa-Plasmid pMB 718 auf E. coli HB 101 und auf den Lebensmittelstamm B85AN übertragen werden.

13. In dem E. coli-Stamm wurden Koloniedimorphismus und Calciumbedürftigkeit exprimiert. Das Autoagglutinationsvermögen des Transformanten war schwer zu beurteilen, während die Serumresistenz ganz klar nicht ausgeprägt wurde.

14. Der mit pMB 718-DNA transformierte Lebensmittelstamm B85ANV^{+} prägte alle plasmidbedingten Merkmale des Donorstammes aus: Koloniedimorphismus, Calciumabhängigkeit, Autoagglutination, Serumresistenz und vor allem auch die Kolonisationsfähigkeit im Tierversuch. Der Rezipient besaß keines dieser Merkmale. Diese Ergebnisse beweisen, daß auch die plasmiddeterminierten Virulenzeigenschaften mit dem Vwa-Plasmid übertragen werden können.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Alonso, J.M., Bejat, J., Bercovier, H., Mollaret, H.H. (1975)
Sur un group de souche de Yersinia enterocolitica fermentant le rhamnose. Med. Malad. Infect. 10: 490-492.

Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., Timmis, K.N. (1981)
Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in Pseudomonas. Gene 16: 237-247.

Bakour , R., Laroche, Y., Cornelis, G. (1983)
Study of the incompatibility and replication the 70-kb virulence plasmid of Yersinia. Plasmid 10: 279-289.

Balligand, G., Laroche, Y., Cornelis, G. (1985)
Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 Yersinia enterocolitica strain: Role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect. Immun. 48: 782-786.

Barth, P.T. und Grinter, N.J. (1974)
Comparison of the deoxyribonucleic acid molecular weights and homologies of plasmids conferring linked resistance to streptomycin and sulfonamides. J. Bacteriol. 120: 618-630.

Barth, P.T., Datta, N., Hedges, R.W. Grinter, N.J. (1976)
Transposition of a deoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R483 to other replicons. J. Bacteriol. 125: 800-810.

Barth, P.T. und Grinter, N.J. (1977)
Map of plasmid RP4 derived by insertion of transposon C. J. Mol. Biol. 113: 455-474.

Barth, P. T., Grinter, N.J., Bradley, D.E. (1978)
Conjugal transfer system of plasmid RP4: Analysis by transposon 7 insertion. J. Bacteriol. 113: 43-52.

Bennett, P.M., Grinsted, J., Choi, C.L., Richmond, M.H. (1978)
Characterization of Tn501, a transposon determining resistance to mercuric ions. Molec. gen. Genet. 159: 101-106.

Bercovier, H., Brenner, D.J., Ursing, J., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Alonso, J.M., Carter, G.P., Mollaret, H.H. (1980a)
Characterization of Yersinia enterocolitica sensu stricto. Curr. Microbiol. 4: 201-206.

Bercovier, H., Ursing, J., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H. (1980b)
Yersinia kristensenii: A new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical Yersinia enterocolitica or Yersinia enterocolitica-like). Curr. Microbiol. 4: 219-224.

Black, R.E., Jackson, R.J., Tsai, T., Medevesky, M., Shayegani, M., Feeley, J.C., MacLeod, K.I.E., Wakelee, A.M. (1978)
Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. N. Engl. J. Med. 298: 76-79.

Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1978)
Molecular nature of the complement lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5655-5659.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screenig recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.

Bockemühl, J. (1982)
Die enteralen Yersiniosen: Pathogenese, klinischer Verlauf, Epidemiologie und Diagnose. Immun. Infekt. 10: 180-186.

Bockemühl, J., Schmitt, H., Bednarek, J. (1978)
Zur Häufigkeit von Darmerkrankungen durch Yersinia enterocolitica. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242: 42-51.

Boehringer (1984)
Restriction map of phage Lambda DNA. Molecular biology, Boehringer Mannheim.

Bölin, I., Norlander, L., Wolf-Watz, H. (1982)
Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid. Infect. Immun. 37: 506-512.

Bölin, I. und Wolf-Watz, H. (1984)
Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. Infect. Immun. 43: 72-78.

Bölin, I., Portnoy, D.A., Wolf-Watz, H. (1985)
Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of Yersiniae. Infect. Immun. 48: 234-240

Borle, A.B. (1973)
Calcium metabolism at the cellular level. Fed. Proc. 32: 1944-1950.

Bottone, E.J. (1977)
Yersinia enterocolitica a panoramic view of a charismatic microorganism. CRC Crit. Rev. Microbiol. 5: 211-241.

Bottone, E.J. (1978)
Atypical Yersinia enterocolitica: Clinical and epidemiological parameters. J. Clin. Microbiol. 7: 562-567.

Bottone, E.J. (1979)
Yersinia intermedia: Temperature-dependent bacteriocin-production. J. Clin. Microbiol. 10: 433-436.

Bottone, E.J., Chester, B., Malowany, M.S., Allerhand, J. (1974)
Unusual Yersinia enterocolitica isolates not associated with mesenteric lymphadenitis. Appl. Microbiol. 5: 858-861.

Bottone, E.J. und Robin, T. (1977)
Yersinia enterocolitica: Recovery and characterization of two unusual isolates from a case of acute enteritis. J. Clin. Microbiol. 5: 341-345.

Braunwald, E. (1982)
Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. N. Engl. J. Med. 307: 1618-1627.

Brenner, D.J. (1979)
Specification in Yersinia. pp. 33-43. In: Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. Immunol. 5. S. Krager, Basel, New York.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Falcao, D.P., Weaver, R.E., Fanning, G.R. (1976).
Characterization of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis by deoxyribonuleic acid hybridization and biochemical reactions. Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 180-194.

Brenner, D.J., Bercovier, H., Ursing, J., Alonso, J.M., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H. (1980)
Yersinia intermedia: A new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called atypical Yersinia enterocolitica or Yersinia enterocolitica-like. Curr. Microbiol. 4: 207-212.

Brubaker, R.R. (1967)
Growth of Pasteurella pseudotuberculosis in simulated intracellular environment. J. Infect. Dis. 117: 403-417.

Brubaker, R.R. (1972)
The genus Yersinia: Biochemistry and genetics of virulence. Curr. Top. Microbiol. 57: 111-158.

Brubaker, R.R. (1979)
Expression of virulence in Yersiniae. pp. 168-171. In Schlessinger, D. (ed), Microbiology-1979. ASM, Washington, D.C.

Brubaker, R.R. (1983)
The vwa^+ virulence factor of Yersiniae: The molecular basis of the attendant nutritional requirement for Ca^{++}. Rev. Infect. Dis. 5, Suppl. 4: 748-758.

Brubaker, R.R. und Surgalla, M.J. (1962)
Pesticins II. Production of pesticin I and II. J. Bacteriol. 84: 539-545.

Brubaker, R.R. und Surgalla M.J. (1964)
The effect of Ca^{++} and Mg^{++} on lysis, growth, and production of virulence antigens by Pasteurella pestis. J. Infect. Dis. 114: 13-25.

Burrows, T.W. (1956)
An antigen determining virulence in Pasteurella pestis. Nature 177: 426-427.

Burrows, T.W. (1963)
Virulence of Pasteurella pestis and immunity to plaque. Ergebn. Mikrobiol. 37: 59-106.

Burrows, T.W. und Bacon, G.A. (1956)
The basis of virulence in Pasteurella pestis: An antigen determining virulence. Brit. J. Exp. Path. 37: 481-493.

Burrows, T.W. und Bacon, G.A. (1960)
V and W antigens in strains of Pasteurella pseudotuberculosis. Brit. J. Exp. Path. 39: 278-291

Carter, P.B. (1975)
Pathogenicity of Yersinia enterocolitica for mice. Infect. Immun. 11: 164-170.

Carter, P.B., MacDonald, T.T., Collins, F.M. (1979)
Host responses to infection with Yersinia enterocolitica. pp. 346-350. In: Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. Immunol. 5. S. Krager, Basel, New York.

Carter, P.B., Zahorchak, R.J., Brubaker, R.R. (1980)
Plaque virulence antigens from Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 28: 638-640.

Cavanaugh, D.C. und Randall, R. (1959)
The role of multiplication of Pasteurella pestis in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plaque. J. Immunol. 83: 348-363.

Chang, M.T. und Doyle, M.P. (1984)
Identification of specific outer membrane polypeptides associated with virulent Yersinia enterocoltica. Infect. Immun. 43: 472-476

Chester, B. und Stotzky, G. (1976)
Temperature-dependent cultural and biochemical characteristics of rhamnose-positive Yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol. 3: 119-127.

Cornelis, G., Wauters, G., Vanderhaeghe, H. (1973)
Pesence de ß-lactamase chez Yersinia enterocolitica. Ann. Microbiol. 124B 139-152.

Cornelis, G. und Abraham, E.P. (1975)
ß-Lactamases from Yersinia enterocolitica. J. Gen. Microbiol. 87: 273-284.

Cornelis, G. und Colson, C. (1975)
Restriction of DNA in Yersinia enterocolitica detected by recipient ability for a derepressed R factor from Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 87: 285-291.

Cornelis, G., Bennett, P.M., Grinsted, J. (1976)
Properties of pGC1, a lac plasmid originating in Yersinia enterocolitica 842. J. Bacteriol. 127: 1058-1062.

Cornelis, G., Ghosal, D., Saedler, H. (1978)
Tn951: A new transposon carrying a lactose operon. Molec. Gen. Genet. 160: 215-224.

Cornelis, G., Sommer, H. Saedler, H. (1981)
Transposon Tn951 (Tn lac) is defective and related to Tn3. Molec. Gen. Genet. 184: 241-248.

David, M., Tronchet, M., Dénarié, J. (1981)
Transformation of Azotobacter vinelandii with plasmids RP4 (IncP-1 group) and RSF 1010 (IncQ group). J. Bacteriol. 146: 1154-1157.

Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D,J. Fanning, G.R. (1978)
Yersinia ruckeri sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 37-44.

Frederiksen, W. (1964)
A study of some Yersinia pseudotuberculosis-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X") pp. 103-104. In: Proc. 14th Scand. Congr. Path. Microbiol., Oslo. Zitiert in: Bottone (1977).

Gemski, P., Lazere, J.R., Casey, T. (1980)
Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 27: 682-685.

Gemski, P., Lazere, J.R. Casey, T., Wohlhieter, J.A. (1980)
Presence of a virulence associated Plasmid in Yersinia pseudotuberculosis. Infect. Immun. 28: 1044-1047.

Goguen, J.D., Yother, J., Straley, S. (1984)
Genetic analysis of the low calcium response in Yersinia pesis Mu dl (Ap lac) insertion mutants. J. Bacteriol. 160: 842-848.

Grinsted, J., Saunders, J.R., Ingram, L.C., Sykes, R.B., Richmond, M.H. (1972)
Properties of an R factor that originated in Pseudomonas aeruginosa 1822. J. Bacteriol. 110: 529-537.

Grinsted, J., Bennett, P.M., Higginson, S., Richmond, M.H. (1978)
Regional preference of insertion of Tn501 and Tn802 into RP1 and its derivatives. Molec. Gen. Genet. 166: 313-320.

Gutman, L.T., Ottesen, E.A., Quan, T.J., Noce, P.S., Katz, S.L. (1973)
An interfamilial outbreak of Yersinia enterocolitica enteritis. N. Engl. J. Med. 288: 1372-1377.

Hässig, A., Karrer, J., Pusterla, F. (1949)
Über Pseudotuberkulose beim Menschen. Schweiz. med. Wschr. 79: 1254-1256.

Hall, P.J., Yang, C.H., Little, R.V., Brubaker, R.R. (1974)
Effect of Ca^{2+} on morphology and division of Yersinia pestis. Infect. Immun. 9: 1105-1113.

Hanna, M.O., Zink, D.L., Carpenter, Z.L., Vanderzant, C. (1976)
Yersinia enterocolitica-like organisms from vacuum-packed beef and lamb. J. Food Sci. 41: 1254-1256.

Hansen, J.B. und Olsen, R.H. (1978)
Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J. Bacteriol. 135: 227-238.

Hammerschmidt, W. und Hellmann, E. (1984)
Plasmidvermittelte Pathogenitätsfaktoren von Yersinia enterocolitica unter epidemiologischen Gesichtspunkten. Zbl. Bakt. Hyg. A 257: 323-342.

Hauröder, B. (1980)
Isolierung und Charakterisierung von Yersinia enterocolitica aus tierischem Untersuchungsmaterial. Diplomarbeit, Bonn.

Heesemann, J., Keller, C., Marawa, R., Schmidt, N., Siemens, H.J., Laufs, R. (1983)
Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: Molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. J. Infect. Dis. 147: 107-115.

Heesemann, J. und Laufs, R. (1983)
Construction of a mobilizable Yersinia enterocolitica virulence plasmid. J. Bacteriol. 155: 761-767.

Heesemann, J., Algermissen, B., (1984)
Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 46: 105-110.

Highsmith, A.K., Feeley, J.C. Morris, G.K. (1977)
Yersinia enterocolitica: A review of the bacterium and recommended laboratory methodology. Health Lab. Sci. 14: 253-260.

Hill, W.E., Payne, W.L., Ausilio, C.C.G. (1983)
Detection and enumeration of virulent Yersinia enterocolitica in food by DNA colony hybridisation. Appl. Environ. Microbiol. 46: 636-641.

Higuchi, K., Kupferberg, L., Smith, J.L. (1959)
Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of Pasteurella pestis. J. Bacteriol. 77: 317-321.

Higuchi, K. und Smith, J.L. (1961)
Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J. Bacteriol. 81: 605-608.

Hubbert, W.T. (1972)
Yersiniosis in mammals and birds of the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 458-463.

Inoue, M. und Kurose, M. (1975)
Isolation of Yersinia enterocolitica from cow's intestinal contents and beef meat. Jap. J. Vet. Sci. 37: 91-93.

Isberg, R.R. und Falkow, S. (1985)
A single genetic locus encoded by Yersinia pseudotuberculosis permits invasion of cultured cells by Escherichia coli K-12. Nature 317: 262-264.

Jackson, S. und Burrows, T.W. (1956)
The pigmentation of Pasteurella pestis on a defined medium containing hemin. Brit. J. Exp. Path. 37: 570-576.

Jacob, A.E. und Grinter, N.J. (1975)
Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering. Nature 255: 504-506.

Jansen, W.A. und Surgalla, M.J. (1969)
Plaque bacillus: survival within host phagocytes. Science 163: 950-952.

Kapperud, G. Jonsson, B. (1976)
Yersinia enterocolitica in brown trout (Salmo trutta) from Norway. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 84: 66-68

Kay, B.A., Wachsmuth, K., Gemski, P. (1982)
New virulence-associated plasmid in Yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol. 15: 1161-1163.

Kay, B.A., Wachsmuth, K., Gemski, P., Feeley, J.C., Quan, T., Brenner, D.J. (1983)
Virulence and phenotypic characterization of Yersinia enterocolitica isolated from humans in the United States. J. Clin. Microbiol. 17: 128-138.

Keness, J. (1980)
The revealing of cryticity of plasmid DNA harbored by two strains of Streptococcus faecium. Dissertation, Bonn.

Kimura, S., Ikeda, T., Eda, T., Mitsui, Y., Nakata, K., (1976)
R plasmids from Yersinia. J. Gen. Microbiol. 97: 141-144.

Kist, M., Langmaack, H., Just, M. (1980)
Ausbreitung einer Yersinia-enterocolitica-Infektion im Krankenhaus. Dtsch. med. Wschr. 105: 185-189.

Knapp, W. (1977)
Yersiniosen - Bakteriologisch-serologische Gesichtspunkte. Med. Welt 28: 1586-1590.

Knapp, W. (1980)
Enterale Yersiniosen. Dtsch. Ärztebl. 77: 1671-1675.

Kojima, M., Suda, S., Hotta, S., Hamada, K. (1970)
Induction of pleomorphy and calcium ion deficiency in Lactobacillus bifidus. J. Bacteriol. 102: 217-220.

Kretsinger, R.H. (1977)
Evolution of the informational role of calcium in eucaryotes. pp. 63-72. In: Wassermann, R.H., et al. (eds), Calcium-binding Proteins and calcium function. Elsevier/North Holland, New York. Zitiert in: Zahorchak und Brubaker (1982).

Krieg, N.R. und Holt, J.G. (eds) (1984)
Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1, Williams & Wilkins Baltimore.

Kupferberg, L.L. und Higuchi, K. (1958)
Role of calcium ions in the stimmulation of growth of virulent strains of Pasteurella pestis. J. Bacteriol. 76: 120-121.

Kushner, S.R. (1978)
An improved method for transformation of Escherichia coli with ColE1 derived plasmids. pp. 17-23. In: Boyer, H.W. und Nicosia, S. (eds), Genetic engineering. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Laird, W.J. und Cavanaugh, D.C. (1980)
Correlation of autoagglutination and virulence of Yersiniae. J. Clin. Microbiol. 11: 430-432.

Laroche, Y., van Bouchante, M., Cornelis, G. (1984)
A restriction map of virulence plasmid pVYE 439-80 from a serogroup 9 Yersinia enterocolitica strain. Plasmid 12: 67-70.

Lassen, J. (1972)
Yersinia enterocolitica in drinking water. Scand. J. Infect. Dis. 4: 125-127.

Lawton, D.W., Erdman, R.L., Surgalla, M.J. (1963)
Biosynthesis and purification of V and W antigen in Pasteurella pestis. J. Immunol. 91: 179-184.

Lazere, J.R. und Gemski, P. (1980)
Association of colony morphology with virulence of Yersinia enterocolitica. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1980, Abstr. D50.

Lazere, J.R. und Gemski, P. (1983)
Association of colony morphology with virulence of Yersinia enterocolitica. FEMS Microbiol. Lett. 17: 121-126.

Lee, W.H. (1977)
An assessment of Yersinia enterocolitica and its presence in foods. J. Food Prot. 40: 486-489.

Lee, W.H., Smith, R.E., Damaré, J.M., Harris, M.E., Johnston, R.W. (1981)
Evaluation of virulence test procedures for Yersinia enterocolitica recovered from foods. J. Appl. Bacteriol. 50: 529-539.

Lederberg, E.M. und Cohen, S.N. (1974)
Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 119: 1072-1074.

Leistner, L., Hechelmann, H., Kashiwazaki, M., Albertz, R. (1975)
Nachweis von Yersinia enterocolitica in Faeces und Fleisch von Schweinen, Rindern und Geflügel. Fleischwirtschaft 11: 1599-1602.

Lichtenstein, C. und Brenner, S. (1981)
Site-specific properties of Tn7 transposition into the E. coli chromosome. Mol. Gen. Genet. 183: 380-387.

Lichtenstein, C. und Brenner, S. (1982)
Unique insertion site of Tn7 in the E. coli chromosome. Nature 297: 601-603.

Little, R.V. und Brubaker, R.R. (1972)
Characterization of deoxyribonuleic acid from Yersinia pestis by ethidium-bromide-cesiumchloride density gradient centrifugation. Infect. Immun. 5: 630-631.

Loghem van , J.J. (1944)
The classification of the plaque-bacillus. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 10: 15-16.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Martinez, R.J. (1983)
Plasmid-mediated and temperature regulated surface properties of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 41: 921-930

Maruyama, T., Une, T., Zen-Yoji, H. (1979)
Observations on the correlation between pathogenicity and serovars of Yersinia enterocolitica by the assay applying cell culture system and experimental mouse infection. pp. 317-323. In: Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. Immunol. 5. S. Krager, Basel, New York.

Mazigh, D., Alonso, J.M., Mollaret, H.H. (1983)
Simple method for demonstration of differential colony morphology of plasmid-associated virulent clones of Yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol. 17: 555-557.

Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S. (1976)
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 127: 1529-1537.

Moore, R.L. und Brubaker, R.R. (1975)
Hybridization of deoxyribonucleic acid sequences of Yersinia enterocolitica and other selected members of Enterobacteriaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 25: 336-339.

Nagahari, K. und Sakaguchi, K. (1978)
RSF 1010 plasmid as a potentially useful vector in Pseudomonas species. J. Bacteriol. 133: 1527-1529.

Niléhn, B. (1969)
Studies on Yersinia enterocolitica (with special reference to bacterial diagnosis and occurence in human acute enteric disease). Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. 206: 1-48.

Niléhn, B. (1973)
The relationship of incubation temperature to serum bactericidal effect, pathogenicity and in vivo survival of Yersinia enterocolitica. pp. 85-92. In: Winblad, S. (ed), Contrib. Microbiol. Immunol. 2. S. Krager, Basel.

Novick, R.P. (1981)
Plasmide. Spekt. Wissenschaft Feb. 1981: 35-51.

Ogg, J.E., Friedman, S.B., Andrews, A.W., Surgalla, M.J. (1958)
Factors influencing the loss of virulence in Pasteurella pestis. J. Bacteriol. 76: 185-191.

Olling, S. (1977)
Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host-parasite relationship in acute and persisting infections. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 10: 1-40.

Pai, C.H. und Mors, V. (1978)
Production of enterotoxin by Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 19: 908-911.

Pai, C.H., Mors, V., Toma, S. (1978)
Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 9: 334-338.

Pai, C.H., Mors, V., Seemayer, T.A. (1980)
Experimental Yersinia enterocolitica enteritis in rabbits. Infect. Immun. 28: 238-244.

Pai, C.H. und DeStephano, L. (1982)
Serum resistance associated with virulence in Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 35: 605-611.

Pearson, A.D., Ricciardi, I.D., Wright, D.H., Suckling, W.G. (1979)
An experimental study of the pathology of Yersinia enterocolitica infection in mice. pp. 335-345. In Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. 5. S. Krager, Basel, New York.

Pedersen, K.B. (1976)
Isolation of Yersinia enterocolitica from Danish swine and dogs. Acta Path. Microbiol. Scand. B84: 317-318.

Perry, R.D. und Brubaker, R.R. (1977)
Accumulation of iron by Yersiniae. J. Bacteriol. 137: 1290-1298.

Perry, R.D. und Brubaker, R.R. (1983)
Vwa^+ phenotype of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 40: 166-171.

Pollack, M.R. (1962)
Exoenzymes. pp. 121-178. In: Gunsalus, I.C. und Stanier, R.Y. (eds), The bacteria, Vol. 4. Academic Press Inc., New York.

Portnoy, D.A., und Falkow, S. (1981)
Virulence-associated plasmids from Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. J. Bacteriol. 148: 877-883.

Portnoy, D.A., Moseley, S.L., Falkow, S. (1981)
Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of Yersinia enterocolitica pathogenesis. Infect. Immun. 31: 775-782.

Portnoy, D.A., Blank, H.F., Kingsbury, D.T., Falkow, S. (1983)
Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in Yersinia pestis. J. Infect, Dis. 148: 297-304.

Primavesi, C.A. (1980)
Die Yersiniose und ihre seuchenhygienische Bedeutung. Öff. Gesundh. Wesen 42: 111-115.

Prpic, J.K., Robbins-Browne, R.M., Dayey, R.B. (1983)
Differentiation between virulent and avirulent Yersinia enterocolitica isolates by using congo red agar. J. Clin. Microbi91. 18: 486-490.

Ricciardi, I.D., Pearson, A.D. Suckling, W.G., Klein, C. (1978)
Long-term fecal excretion and resistance induced in mice infected with Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 21: 342-344.

Rosen, B.P. und Brey, R.N. (1979)
Calcium-proton antiport. pp. 62-66. In: Schlessinger, D. (ed), Microbiology-1979. ASM, Washington, D.C.

Schleifstein, J.I. und Coleman, M.B. (1939)
An identified microorganism resembling B. lignieri and Past. pseudotuberculosis, and pathogenic for man. N. Y. State J. M. 15: 1749- 1753.

Schiemann, A.D. (1978)
Isolation of Yersinia enterocolitica from surface and wellwaters in Ontario. Can. J. Microbiol. 24: 1048-1052.

Schiemann, D.A. und Toma, S. (1978)
Isolation of Yersinia enterocolitica from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 35: 54-58.

Shayegani, M., Morse, D., de Forge, I., Root, T., Malmberg Parsons, L., Maupin, P.S. (1983)
Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by Yersinia enterocolitica serotyp O:8. J. Clin. Microbiol. 17: 35-40.

Silver, S., Toth, K., Scribner, H. (1975)
Facilitated transport of calcium by cells and subcellular membranes of Bacillus subtilis and Escherichia coli. J. Bacteriol. 122: 880-885.

Silver, S. (1977)
Calcium transport in microorganisms. pp. 49-101. In: Weinberg, E.D. (ed), Microorganisms and minerals. Marcel Dekker Inc., New York.

Skurnik, M., Bölin, I., Heikkinen, H., Pika, S., Wolf-Watz, H. (1984)
Virulence plasmid-associated autoagglutination in Yersiniae spp. J. Bacteriol. 158: 1033-1036.

Smith, J.E. und Thal, E. (1965)
A taxonomic study of the genus Pasteurella using a numerical technique. Acta Path. Microbiol. Scand. 64: 213-223.

Smith, R.E., Carey, A.M., Damaré, J.M., Hetrick, F.M., Johnston, R.W., Lee, W. H. (1981)
Evaluation of iron dextran and mucin for enhancement of the virulence of Yesinia enterocolitica serotype O:3 in mice. Infect. Immun. 34: 550-560.

Sneath, P.H.A. und Cowan, S.T. (1958)
An electro-taxonomic survey of bacteria. J. Gen. Microbiol. 19: 551-565.

Snellen, J.E. und Raj, H.D. (1970)
Morphogenesis and fine structure of Leucothrix mucor and effects of calcium deficiency. J. Bacteriol. 101: 240-249.

Sparling, P.F. (1983)
Bacterial virulence and pathogenesis: An overview. Rev. Infect. Dis. 5, Suppl. 4: 637- 646.

Stevens, M. und Mair, N.S. (1973)
A numerical taxonomic study of Yersinia enterocolitica strains. pp. 17-22. In: Winblad, S. (ed), Contrib. Microbiol. 2. S. Krager, Basel.

Straley, S.C. und Brubaker, R.R. (1981)
Cytoplasmatic and menbrane proteins of Yersiniae cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1224-1228.

Surgalla, M.J. und Beesley, E.D. (1969)
Congo red-agar plating medium for detecting pigmentation in Pasteurella pestis. Appl. Bacteriol. 18: 834-837.

Surgalla, M.J. (1960)
Properties of virulent and avirulent strains of Pasteurella pestis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 88: 1136-1145. Zitiert in Brubaker (1972).

Tacket, C.O., Ballard, J., Harris, N., Allard, J., Nolan, C., Quan, T., Cohen, M.L. (1985)
An outbreak of Yersinia enterocolitica caused by contaminated tofu (soybean curd). Am. J. Epidemiol. 121: 705-711.

Talbot, J. und Sneath, P.H.A. (1960)
A taxonomic study of Pasteurella septica, especially strains isolated from human sources. J. Gen. Microbiol. 22: 303-320.

Taylor, P.W. (1983)
Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 47: 46-83.

Taylor, P.W. und Kroll, H.-P. (1983)
Killing of an encapsulated strain of Escherichia coli by human serum. Infect. Immun. 39: 122-131.

Thal, E. (1954)
Untersuchungen über Pasteurella pseudotuberculosis. Thesis, Berlingska Boktryckeriet, Lund. Zitiert in Bottone (1977).

Toma, S. und Deiderick, V.R. (1975)
Isolation from Yersinia enterocolitica from swine. J. Clin. Microbiol. 2: 478-481.

Tsubokura, M., Otsuki, K., Itagaki, K. (1973)
Studies on Yersinia enterocolitica I. Isolation of Yersinia enterocolitica from swine. Jap. J. Vet. Sci. 35: 419-424.

Une, T. (1977)
Studies on the pathogenicity of Yersinia enterocolitica I. Experimental infection in rabbits. Microbiol. Immunol. 21: 249-363.

Une, T. und Zen-Yoji, H. (1979)
Investigations on the pathogenicity of Yersinia enterocolitica by experimental infection in rabbits and cultured cells. pp. 304-309. In: Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. Immunol. 5. S. Krager, Basel, New York.

Une, T. und Brubaker, R.R. (1984)
In vivo comparison of avirulent vwa^- and pgm^- or pst^+ phenotypes of Yersiniae. Infect. Immun. 43: 895-900.

Ursing, J., Brenner, D.J., Bercovier, H., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., Brault, J., Mollaret, H-H. (1980)
Yersinia frederiksenii: A new species of enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive strains (formerley called atypcal Yersinia enterocolitica or Yersinia enterocolitica-like). Curr. Microbiol. 4: 213-217.

Wauters, G. (1970)
Contribution à L'étude de Yersinia enterocolitica. Thèse, Louvain.

Wauters, G., und Janssens, M. (1976)
Portage de Yersinia enterocolitica par le porc de boucherie. II. Recherche de Yersinia enterocolitica sur les langues de porc achetées en boucherie. Méd. Mal. infec. 6: 517-519.

Weaver, R.E. und Jordan, J.G. (1973)
Recent human isolates of Yersinia enterocolitica in the United States. pp. 120-125. In: Carter, P.B., Lafleur, L., Toma, S. (eds), Contrib. Microbiol. Immunol. 2. S. Krager, Basel.

Willets, N. (1984)
Conjugation. p 46. In: Bennett, P.M. und Grinsted, J. (eds), Methods in Microbiol. vol. 17. Academic Press Inc., London.

Wilson, H.D., McCormick, J.B., Feeley, J.C. (1976)
Yersinia enterocolitica infection in a 4 month old infant associated with infection in household dogs. J. Pediatrics, 89: 767-769.

Zahorchak, R.J., Charnetzky, W.T., Little, R.V., Brubaker, R.R. (1979)
Consequences of Ca^{2+} deficiency on macromolecular synthesis and adenylate energy charge in Yersinia pestis. J. Bacteriol. 139: 792-799.

Zahorchak, R.J. und Brubaker, R.R. (1982)
Effect of exogenous nucleotides on Ca^{2+} dependency and V antigen synthesis in Yersinia pestis. Infect. Immun. 38: 953-959.

Zen-Yoji, H., Sakai, S., Maruyama, T., Yanagawa, Y. (1974)
Isolation of Yersinia enterocolitica from swine, cattle and rats at an Abattoir. Jap. J. Microbiol. 18: 103-105.

Zink, D.L., Feeley, J.C., Wells, J.G., Vanderzant, C., Vickery, J.C., Roof, D. W., O'Donovan, G.A. (1980)
Plasmid-mediated tissue invasiveness in Yersinia enterocolitica. Nature 283: 224-226.

Zsigray, R.M., Lawton, W.D., Surgalla, M.J. (1983)
Repression of the virulence of Yersinia pestis by an F' plasmid. Infect. Immun. 39: 974-976.

Herrn Prof. Dr. J. Krämer möchte ich für die Betreuung der Arbeit danken, ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H.-G. Trüper für die Übernahme des Korreferates.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Dr. P. Gemski vom Walter Reed Army Institute of Research für die freundliche und großzügige Aufnahme und die hilfreiche Unterstützung während meines Aufenthaltes in seinem Labor verpflichtet.

Dem DAAD danke ich für die Gewährung des Aufenthaltsstipendiums.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. R. Neill und Herrn Dr. D. Kopecko vom Walter Reed Army Institute of Research für das Überlassen von Stämmen sowie für äußerst wertvolle Hinweise und Impulse.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie von Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann, vor allem Frau Dipl. Biol. G. Korfmann, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, und von der viele wertvolle Anregungen gekommen sind.

Besonders verbunden fühle ich mich Herrn Dr. G. McKenzie für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die unermüdliche und hilfreiche Diskussionsbereitschaft sowie für die Vermittlung des Aufenthaltes bei Herrn Dr. Gemski.

Mein Dank gebührt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie, insbesondere den Kollegen von der Abteilung für Landwirtschaftliche und Lebensmittelmikrobiologie, für ihre Hilfe und Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann für sein Verständnis und seine Geduld ganz herzlich bedanken.

Lebenslauf (tabellarisch)

Persönlicher Werdegang:

geboren	am 29.06.1955 als Tochter der Eheleute Franz Hauröder und Hedwig Hauröder geb. Brohlburg in Neuwied (Rheinland-Pfalz)
verheiratet	seit dem 04.05.1982 mit Werner Philippczyk Seither trage ich den Namen Hauröder-Philippczyk.

Schulischer und beruflicher Werdegang:

Einschulung	am 03.05.1962 in die St. Castor Volksschule in Miesenheim
Gymnasium	von 1966 bis 1974 Besuch des Neusprachlichen Bertha-von-Suttner-Gymnasiums in Andernach
Abitur	20.05.1974
Immatrikulation	02.10.1974 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn für das Fach Biologie
Diplom-Vorprüfung	15.11.1976
Diplom	mündliche Prüfung am 03.05.1979 Anfertigung der Diplomarbeit von Juli 1979 - 01.12.1980 im Institut für Mikrobiologie unter Anleitung von Herrn Prof. J. Krämer. Thema: Isolierung und Charakterisierung von Yersinia enterocolitica aus tierischem Untersuchungsmaterial
Promotion	im Oktober 1981 Beginn der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation Thema: Untersuchung zur Pathogenität von Yersinia enterocolitica - Charakterisierung und Transfer des Vwa-Plasmides
Forschungsaufenthalt	von April 1983 - September 1983 am Walter Reed Army Institute of Research, Department of Biological Chemistry, in Washington, D.C.